

UNIVERSITE DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Série U N° 6

Contribution à l'Etude
des Eliminations Urinaires
par la Méthode du Relargage

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de
Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

présentée et soutenue le 8 Avril 1938

PAR

Maurice LACHAUX

Docteur en Pharmacie
Pharmacien des Hôpitaux
Licencié es sciences

JURY { MM. FABRE, *Président.*
DELABY, *Professeur.*
CHARONNAT, *Maître de Conférences.*

P. VIROL
Editeur

23 Rue du Souvenir - Colombes

1938

Contribution à l'étude des
Eliminations urinaires par la méthode
du relargage

UNIVERSITE DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Série U N° 6

Contribution à l'Etude
des Eliminations Urinaires
par la Méthode du Relargage

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

présentée et soutenue le *Avril 1938*

PAR

Maurice LACHAUX

Docteur en Pharmacie
Pharmacien des Hôpitaux
Licencié es sciences

JURY { MM. FABRE, *Président.*
DELABY, *Professeur.*
CHARONNAT, *Maître de Conférences.*

P. VIROL

Editeur

23 Rue du Souvenir - Colombes

1938

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

MM. GUERIN, *Doyen*, O. ✱, ☼ I.
 P. LEBEAU, *Assesseur*, O. ✱, ☼ I., Membre de l'Institut.
 P. DESPORT, *Secrétaire*, ✱, ☼ I.

PROFESSEURS

MM. GUERIN, O. ✱, ☼ I.	Botanique générale.
LEBEAU, O. ✱, ☼ I., Membre de l'Institut	Pharmacie chimique.
GORIS, O. ✱, ☼ I.	Pharmacie galénique.
DAMIENS, ✱, ☼ I.	Chimie minérale.
HERISSEY, O. ✱, ☼ I.	Chimie biologique.
SOMMELET, ✱, ☼ I.	Chimie organique.
LUTZ, ✱, ☼ I.	Cryptogamie et Microbiologie.
FABRE, ✱, ☼ I.	Toxicologie.
LAUNOY, O. ✱, ☼ I.	Zoologie.
DELABY, ✱, ☼ I.	Chimie analytique.
PICON, ☼ I.	Physique.
MASCRÉ, ☼ I.	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale.

Doyen honoraire : M. RADAIS, O. ✱, ☼ I.

Professeurs honoraires :

MM. BEHAL, G.O. ✱, ☼ I. et DELEPINE, O. ✱, ☼ I., membres de l'Institut
 GUERBET, ✱, ☼ I. PERROT, C. ✱, ☼ I., COUTIERE, O. ✱, ☼ I.
 BOUGAULT, O. ✱, ☼ I. et TASSILLY, O. ✱, ☼ I.

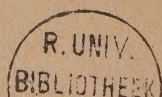
MAITRES DE CONFERENCES

MM. BACH, ☼ I.	Microbiologie.
FLEURY, ☼ I.	Hydrologie et Hygiène.
BEDEL, ☼ I.	Minéralogie et Législation et Déontologie pharmaceutiques.
REGNIER, ☼ I.	Parasitologie.
CHARONNAT, ☼ I.	Chimie et Pharmacie Chimique.
JANOT	Pharmacie galénique et biologie végétale.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DOMANGE . Travaux pratiques de 1 ^{re} année..	Chimie générale et pharmaceutique.
GAUTIER .. Travaux pratiques de 2 ^e et 3 ^e année	Chimie analytique.
GUILLOT, . Travaux pratiques de 4 ^e année ..	Pharmacie chimique et Chimie biologique.
PARIS	Micrographie.
X	Physique.
DEVAL, ✱, ☼ I.	Microbiologie.

Bibliothécaire en Chef : M. GARNIER, ☼ A.



A MON PERE

A MA FAMILLE

A MES AMIS

A MON MAÎTRE

RAYMOND CHARONNAT

*Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie
Pharmacien des Hôpitaux
Docteur ès-Sciences.*

INTRODUCTION

Le relargage est un phénomène banal, utilisé depuis fort longtemps dans l'industrie des savons, et qui consiste à précipiter les savons alcalins de leur solution aqueuse par addition d'un sel neutre, généralement le chlorure de sodium.

En chimie biologique, cette méthode est d'utilisation plus récente. Le nom de relargage n'est d'ailleurs généralement pas utilisé : on « précipite » certaines protéines au moyen d'un sel neutre.

MÉHU, au siècle dernier (1878), avait appliqué ce procédé pour séparer quelques pigments urinaires.

Puis, le relargage semble tomber dans l'oubli, au laboratoire seulement car l'industrie qui l'utilise toujours pour séparer les savons, l'adopte à nouveau pour isoler les matières colorantes et l'acide benzène sulfonique dans la préparation du phénol.

C'est surtout depuis une quinzaine d'années que le phénomène a fait l'objet d'une étude systématique des physico-chimistes. DEBYE, FREUNDLICH, HAFFNER, HOFMEISTER, PAULI, entre autres s'efforcent de trouver les lois qui le régissent. Mais toujours il est appliqué à des solutions pures de composés organiques, de phénol par exemple. Aucun de ces auteurs ne tente l'application de cette méthode à l'extraction des substances biologiques. Nous verrons toutefois que WEISS puis CHARNAS ont utilisé le relargage pour extraire ou doser respectivement la bilirubine et l'urobiline (nous laisserons ici de côté les nombreux travaux relatifs à la précipitation des protéines).

Le procédé est cependant fort séduisant. Outre sa simplicité et sa rapidité, il offre en effet l'énorme avantage de réduire au minimum les chances d'altération des substances relargables que l'on a coutume d'extraire au moyen de solvants volatils ou en s'aidant de réactifs chimiques et le plus souvent du chauffage. De plus, dans certains cas, la méthode de relargage est infiniment plus subtile : ne sera-t-il pas plus facile d'extraire et de doser quelques milligrammes de cholestérol ou des poids plus faibles encore d'oestrone dans un relargat pesant quelques grammes que de procéder à de longs et dispendieux épuisements à l'éther ou au chloroforme de plusieurs litres d'urine ?

Le but du présent travail est l'étude du comportement des constituants de l'urine lors de la saturation de ce liquide par le sulfate d'ammonium et l'application à l'étude des éliminations urinaires. Toutefois, parmi l'infinie variété des substances rencontrées, nous avons dû choisir quelques cas simples ou typiques, nous réservant pour l'avenir d'élargir le champ de nos investigations.

Lorsque cela nous a été possible, nous avons joint à la caractérisation des corps relargables, une méthode de dosage basée sur ce procédé physique.

Certains problèmes ont nécessité un travail particulier en marge du relargage proprement dit, soit parce qu'ils n'avaient pu recevoir de solution au moyen de ce procédé (c'est le cas du dosage de la bilirubine), soit parce qu'il nous a paru indispensable de fixer un point dans la caractérisation de certains composés (c'est le cas de la caractérisation des barbituriques). Ces problèmes spéciaux seront traités à part, à la suite des chapitres se rapportant plus spécialement au relargage des substances qui les concernent.

Pour cette étude nous avons adopté le plan suivant :

Première partie : notions générales sur le relargage

Deuxième partie : application du relargage à l'étude des éliminations urinaires normales.

Chapitre premier : substances azotées :

urée, acide urique, acides aminés et dérivés, pigments normaux, créatinine.

INTRODUCTION

Le relargage est un phénomène banal, utilisé depuis fort longtemps dans l'industrie des savons, et qui consiste à précipiter les savons alcalins de leur solution aqueuse par addition d'un sel neutre, généralement le chlorure de sodium.

En chimie biologique, cette méthode est d'utilisation plus récente. Le nom de relargage n'est d'ailleurs généralement pas utilisé : on « précipite » certaines protéines au moyen d'un sel neutre.

MÉHU, au siècle dernier (1878), avait appliqué ce procédé pour séparer quelques pigments urinaires.

Puis, le relargage semble tomber dans l'oubli, au laboratoire seulement car l'industrie qui l'utilise toujours pour séparer les savons, l'adopte à nouveau pour isoler les matières colorantes et l'acide benzène sulfonique dans la préparation du phénol.

C'est surtout depuis une quinzaine d'années que le phénomène a fait l'objet d'une étude systématique des physico-chimistes. DEBYE, FREUNDLICH, HAFFNER, HOFMEISTER, PAULI, entre autres s'efforcent de trouver les lois qui le régissent. Mais toujours il est appliqué à des solutions pures de composés organiques, de phénol par exemple. Aucun de ces auteurs ne tente l'application de cette méthode à l'extraction des substances biologiques. Nous verrons toutefois que WEISS puis CHARNAS ont utilisé le relargage pour extraire ou doser respectivement la bilirubine et l'urobiline (nous laisserons ici de côté les nombreux travaux relatifs à la précipitation des protéines).

Le procédé est cependant fort séduisant. Outre sa simplicité et sa rapidité, il offre en effet l'énorme avantage de réduire au minimum les chances d'altération des substances relargables que l'on a coutume d'extraire au moyen de solvants volatils ou en s'aidant de réactifs chimiques et le plus souvent du chauffage. De plus, dans certains cas, la méthode de relargage est infiniment plus subtile : ne sera-t-il pas plus facile d'extraire et de doser quelques milligrammes de cholestérol ou des poids plus faibles encore d'oestrone dans un relargat pesant quelques grammes que de procéder à de longs et dispendieux épuisements à l'éther ou au chloroforme de plusieurs litres d'urine ?

Le but du présent travail est l'étude du comportement des constituants de l'urine lors de la saturation de ce liquide par le sulfate d'ammonium et l'application à l'étude des éliminations urinaires. Toutefois, parmi l'infinie variété des substances rencontrées, nous avons dû choisir quelques cas simples ou typiques, nous réservant pour l'avenir d'élargir le champ de nos investigations.

Lorsque cela nous a été possible, nous avons joint à la caractérisation des corps relargables, une méthode de dosage basée sur ce procédé physique.

Certains problèmes ont nécessité un travail particulier en marge du relargage proprement dit, soit parce qu'ils n'avaient pu recevoir de solution au moyen de ce procédé (c'est le cas du dosage de la bilirubine), soit parce qu'il nous a paru indispensable de fixer un point dans la caractérisation de certains composés (c'est le cas de la caractérisation des barbituriques). Ces problèmes spéciaux seront traités à part, à la suite des chapitres se rapportant plus spécialement au relargage des substances qui les concernent.

Pour cette étude nous avons adopté le plan suivant :

Première partie : notions générales sur le relargage

Deuxième partie : application du relargage à l'étude des éliminations urinaires normales.

Chapitre premier : substances azotées :

urée, acide urique, acides aminés et dérivés, pigments normaux, créatinine.

Chapitre second : substances non azotées : glucides et dérivés, acides organiques, phénols, lipides, hormones sexuelles, vitamines, auxines, composés hors groupe, anticorps, antisérum, insuline, enzymes.

Troisième partie : application du relargage à l'étude des éliminations urinaires pathologiques.

Chapitre premier : substances d'origine purement endogène

A) Glucides et dérivés

B) Protides

C) Pigments anormaux, substances biliaires, rouge scatolique, acides biliaires, bilirubine, urobiline.

Chapitre second : substances d'origine exogène (médicamenteuse)

Barbituriques

Atophan.

Au moment de présenter cette étude, notre pensée se reporte avec émotion à tous les maîtres qui nous ont inspiré l'amour du travail, la curiosité scientifique, le désir de faire œuvre personnelle.

Le premier nom qui se présente à notre esprit est celui de M. R. CHARONNAT, maître de conférences à la Faculté de pharmacie, pharmacien-chef de l'Hospice d'Ivry. Au cours des trois années de notre internat, il nous a guidé chaque jour avec une infinie bonté. C'est grâce à son érudition scientifique que nous avons pu mener à bien cette étude. Qu'il soit assuré de notre reconnaissance profonde et de notre sincère affection.

M. le Professeur R. FABRE a bien voulu nous accepter il y a déjà longtemps dans son laboratoire. Il n'a cessé de nous prodiguer des conseils et des encouragements de toute nature ; sa généreuse intervention nous a permis d'obtenir de la Faculté des bourses qui nous ont aidé à effectuer ce travail et à poursuivre nos études supérieures. Qu'il veuille bien accepter l'hommage de notre reconnaissance et de nos remerciements.

Que le Conseil de la Faculté de pharmacie trouve ici l'expression de notre gratitude pour l'intérêt qu'il nous a manifesté.

M. le professeur R. DELABY nous a toujours accueilli avec

une grande bienveillance. Nous lui sommes particulièrement reconnaissant d'avoir bien voulu nous compter parmi ses élèves et d'avoir accepté de faire partie de notre jury.

Nous ne pouvons oublier non plus notre premier maître, celui qui nous a initié à la pratique de la pharmacie lors de notre stage, nous voulons dire M. G. FOURNIER, pharmacien à Champlitte notre petite ville natale. Nous lui renouvelons ici nos sentiments les plus affectueux.

PREMIERE PARTIE

NOTIONS GENERALES SUR LE RELARGAGE

NOTIONS GENERALES SUR LE RELARGAGE

Les facteurs de la solubilité d'une substance dans un solvant restent assez mystérieux; nous nous occuperons ici exclusivement de la solubilité des substances organiques dans l'eau.

Expérimentalement, on peut classer les groupements fonctionnels des combinaisons organiques en deux groupes :

Les uns augmentent la solubilité dans l'eau, ce sont les groupes hydrophiles : OH, NH₂, COOH, CONH₂, —CO—, =N—OH.

Les autres ne favorisent pas, ou ne favorisent guère, la dissolution dans l'eau, ce sont les groupes —CH₃, =CH₂, ≡CH, des hydrocarbures, le groupement ester —COOR, le groupement éther —OR.

On peut dire, avec M. DUCLAUX (1), qu'un groupe hydrophile n'est efficace que s'il n'est pas entouré d'un trop grand nombre de groupes indifférents.

Dans la série des acides gras normaux, les premiers termes, jusqu'en C₃ sont entièrement miscibles à l'eau ; le quatrième CH₃ — (CH₂)₂ — CO₂H présente déjà une solubilité limitée à basse température, $\begin{smallmatrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{smallmatrix} > \text{CH}.\text{CO}_2\text{H}$ et CH₃ (CH₂)₃ CO₂H sont de moins en moins solubles.

L'accumulation des groupes hydrophiles augmente la solubilité dans l'eau : la phloroglucine, l'hydroquinone, sont beaucoup plus solubles que le phénol, lequel a une solubilité très supérieure à celle du benzène.

Si l'on considère l'effet d'une deuxième substance sur la solubilité d'une autre dans l'eau, on observe qu'elle peut s'exercer dans deux sens ; nous n'examinerons que l'effet des sels : ou bien le sel ajouté augmente la solubilité dans l'eau, on dit qu'il y a hydrotropie, ou bien il diminue cette solubilité, on parle de relargage. Les termes hydrotropie et relargage doivent être réservés aux cas dans lesquels la solubilisation et l'insolubilisation ne sont pas le résultat de la formation d'une espèce chimique nouvelle (cf. Raymond CHARONNAT (2)).

La solubilité dans l'eau d'un liquide non miscible avec elle, permet d'exprimer facilement l'effet hydrotrope de l'effet relargant. Pour chaque température, entre certaines limites, il y a deux mélanges en équilibre, l'un correspond à la saturation du liquide dans l'eau, l'autre, à la saturation de l'eau dans le liquide (fig. 1). Ceci se traduit, sur le diagramme température-concentration des mélanges, dans le cas le plus général (exemple nicotine-eau), par une courbe fermée qui limite un domaine de

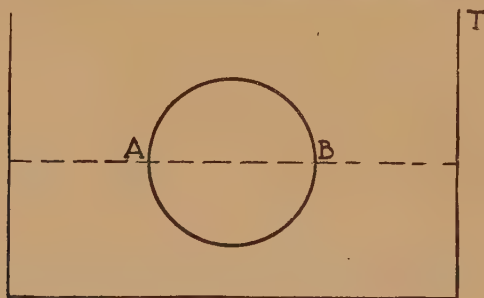


Fig. 1

100 Eau
0 Liquide

0 Liquide
100 Liquide

démixtion ; mais souvent, dans les conditions où l'on peut expérimenter, on n'observe que la partie supérieure de la courbe (exemple aniline-eau) ou la partie inférieure (exemple triméthylamine-eau). Le point maximum est appelé température critique supérieure de dissolution, le minimum est la température critique inférieure de dissolution. Au-dessus du premier ou au-dessous du second, liquide et eau sont intégralement miscibles.

Lorsqu'on ajoute une autre substance ayant une solubilité du même ordre de grandeur dans les deux solvants, la solubilité mutuelle augmente, la température critique supérieure s'abaisse,

la température critique inférieure s'élève, le domaine de démixtion se réduit (effet hydrotrope).

Lorsqu'on ajoute une substance beaucoup plus soluble dans un des solvants que dans l'autre, la solubilité mutuelle diminue, la température critique supérieure s'élève, la température critique inférieure s'abaisse, le domaine de démixtion s'étend (effet relargant).

Si le liquide ajouté à l'eau était entièrement miscible avec elle, l'effet relargant se traduira par l'apparition d'une zone de démixtion ; celle-ci reste virtuelle pour des doses insuffisantes du sel relargant. Ainsi, dans un mélange d'éthanol et d'eau, l'addition de carbonate de potassium ou de sulfate d'ammonium à concentration suffisante, provoque la séparation de deux phases l'une riche en alcool, l'autre riche en eau. L'alcool est devenu incomplètement miscible à l'eau.

Les phénomènes restent les mêmes si la première substance dissoute dans l'autre est un solide ; l'exemple du pyramidon étudié par M. Raymond CHARONNAT (3), montre la coexistence d'une courbe de solubilité banale d'un solide et d'une courbe de démixtion fermée de liquides non miscibles.

L'addition à une solution aqueuse telle que l'urine d'une substance relargante, peut donc permettre de précipiter certains constituants normalement très solubles, et ceci, sans transformation chimique. Elle permet en outre d'extraire par l'alcool éthylique rendu incomplètement miscible, une substance soluble dans ce véhicule et partiellement relarguée.

Substances relargables

Une substance est d'autant plus facilement relargable que sa solubilité dans l'eau est moindre. Si l'on considère une série homologue (alcools, acides et leurs sels alcalins), la facilité de relargage croît avec le poids moléculaire. On utilise depuis longtemps le relargage des savons par les sels alcalins ; le mot relargage, d'origine ancienne, est précisément tiré de l'industrie des savons.

La multiplication des groupements hydrophiles et surtout leur rapprochement dans la molécule, peut s'opposer au relargage ; ainsi l'alcool propylique relargue facilement sous l'action du sulfate d'ammonium, la glycérine ne relargue point.

Le relargage n'est pas limité aux cristalloïdes (électrolytes

ou non), il s'étend aux colloïdes ; la précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium n'est pas essentiellement différente de celle des substances plus simples, celle des matières colorantes par le chlorure de sodium est une opération courante de leur fabrication.

Substances relargantes

Des travaux déjà anciens ont fixé l'ordre d'activité des ions vis-à-vis de la précipitation de l'ovalbumine dans ses solutions aqueuses.

HOFMEISTER (4) les a classés de la façon suivante :
anions $\text{SO}_4 > \text{PO}_4 > \text{acétate} > \text{citrate} > \text{CO}_3\text{H} > \text{CrO}_4 > \text{Cl} > \text{NO}_3 > \text{ClO}_3$
cathions $\text{Li} > \text{Na} > \text{K} > \text{NH}_4 > \text{Mg}$

PAULI (5) a fourni pour les anions une liste un peu plus complète :

$\text{F} > \text{SO}_4 > \text{PO}_4 > \text{citrate} > \text{tartrate} > \text{acétate} > \text{Cl} > \text{NO}_3 > \text{ClO}_3 > \text{Br} > \text{I} > \text{CNS}$

Classifications fort voisines de celles de FREUNDLICH (6) pour les cathions $\text{Li} > \text{Na} > \text{K} > \text{Rb} > \text{Cs}$.

et pour les anions $\text{SO}_4 > \text{F} > \text{Cl} > \text{Br} > \text{NO}_3 > \text{I} > \text{CNS}$.

On observe en gros les mêmes résultats lorsqu'on passe de la précipitation de l'ovalbumine à celle d'autres substances plus simples.

Le choix de la substance relargante s'est trouvé, quant à nous, limité par les conditions suivantes : neutralité du sel, solubilité élevée, prix modique. La neutralité du sel, en vue d'éviter toute altération des produits à extraire ; le prix modique, pour éviter une récupération du sel dans les liquides très complexes.

Ces trois conditions nous ont paru le mieux réalisées par le sulfate d'ammonium, dont la solubilité dépasse légèrement 70 grammes pour 100 centimètres cubes d'eau à la température ordinaire et dont la dissolution s'effectue très rapidement.

Mode d'extraction des substances relarguées

Nous nous sommes adressés, suivant les besoins :

- a) soit à la récolte simple des substances précipitées en ajoutant 70 grammes de sulfate d'ammonium pour

100 cm³ d'urine en tiédissant légèrement, puis en refroidissant.

- b) soit à l'extraction par l'alcool éthylique, de l'urine saturée de sulfate d'ammonium, l'éthanol enlève non seulement les substances relarguées qu'il peut dissoudre, mais aussi des substances non relargables et du sulfate d'ammonium ; nous n'avons utilisé cette dernière méthode, moins pratique, que dans les cas où la substance à extraire précipitait incomplètement.

Lorsqu'on sature l'urine de sulfate d'ammonium, soit par agitation à froid, soit en s'aidant de la chaleur puis abandonnant le liquide au refroidissement, on voit apparaître un dépôt floconneux brunâtre en même temps que se développe une odeur particulière. Parmi les constituants de l'urine, il en est qui restent en solution, d'autres qui relarguent en totalité ou en partie. Cette dernière fraction constitue le dépôt brunâtre que nous venons de voir. On peut la séparer aisément par filtration sur papier ; il est commode d'utiliser pour cela un entonnoir de Buchner monte sur une fiole de Kitasato dans laquelle on fera le vide au moyen d'une trompe à eau. On peut obtenir d'emblée un liquide limpide, coloré en jaune pâle ; sur le filtre reste un magma brun à odeur forte, souillé parfois d'un excès de sulfate d'ammonium. Le poids de ce précipité, débarrassé de sulfate d'ammonium (*) et desséché, est d'environ 1 gramme par litre d'urine normale.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) M. DUCLAUX, *Traité de chimie physique appliquée à la biologie*, Paris 1934, 1, 49.
(2) Raymond CHARONNAT, *J. Pharm. Chim.*, 1937, 25, 178.
(3) Raymond CHARONNAT, *Bull. Sc. Pharm.*, 1927, 34, 545.
(4) HOFMEISTER, *Arch. exp. Path. Pharm.*, 1888, 24, 247.
(5) PAULI, *Beitr. Chem. Physiol. Path.*, 1903, 3, 223 ; 1904, 5, 27.
(6) FREUNDLICH, in *Kapillarchemie*, 1932, 2, 368.

(*) Dans ce relargat, nous avons dosé le sulfate d'ammonium par déplacement de l'ammoniaque au moyen de la magnésie, entraînement par la vapeur d'eau et titrage du distillat au moyen d'acide sulfurique décinormal en présence d'alizarine sulfonate de sodium.

100 cm³ d'urine en tiédissant légèrement, puis en refroidissant.

- b) soit à l'extraction par l'alcool éthylique, de l'urine saturée de sulfate d'ammonium, l'éthanol enlève non seulement les substances relarguées qu'il peut dissoudre, mais aussi des substances non relargables et du sulfate d'ammonium ; nous n'avons utilisé cette dernière méthode, moins pratique, que dans les cas où la substance à extraire précipitait incomplètement.

Lorsqu'on sature l'urine de sulfate d'ammonium, soit par agitation à froid, soit en s'aidant de la chaleur puis abandonnant le liquide au refroidissement, on voit apparaître un dépôt floconneux brunâtre en même temps que se développe une odeur particulière. Parmi les constituants de l'urine, il en est qui restent en solution, d'autres qui relarguent en totalité ou en partie. Cette dernière fraction constitue le dépôt brunâtre que nous venons de voir. On peut la séparer aisément par filtration sur papier ; il est commode d'utiliser pour cela un entonnoir de Buchner monte sur une fiole de Kitasato dans laquelle on fera le vide au moyen d'une trompe à eau. On peut obtenir d'emblée un liquide limpide, coloré en jaune pâle ; sur le filtre reste un magma brun à odeur forte, souillé parfois d'un excès de sulfate d'ammonium. Le poids de ce précipité, débarrassé de sulfate d'ammonium (*) et desséché, est d'environ 1 gramme par litre d'urine normale.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) M. DUCLAUX, *Traité de chimie physique appliquée à la biologie*, Paris 1934, 1, 49.
(2) Raymond CHARONNAT, *J. Pharm. Chim.*, 1937, 25, 178.
(3) Raymond CHARONNAT, *Bull. Sc. Pharm.*, 1927, 34, 545.
(4) HOFMEISTER, *Arch. exp. Path. Pharm.*, 1888, 24, 247.
(5) PAULI, *Beitr. Chem. Physiol. Path.*, 1903, 3, 223 ; 1904, 5, 27.
(6) FREUNDLICH, in *Kapillarchemie*, 1932, 2, 368.

(*) Dans ce relargat, nous avons dosé le sulfate d'ammonium par déplacement de l'ammoniaque au moyen de la magnésie, entraînement par la vapeur d'eau et titrage du distillat au moyen d'acide sulfurique décinormal en présence d'alizarine sulfonate de sodium.

DEUXIEME PARTIE

**APPLICATION DU RELARGAGE
A L'ETUDE DES ELIMINATIONS URINAIRES NORMALES**

CHAPITRE PREMIER

Substances azotées de l'urine normale

Si l'on connaît bien les plus abondantes des substances azotées de l'urine normale, il reste beaucoup à apprendre sur les autres peu abondantes ou inconnues, ces dernières représentant 6 % de l'azote total d'après LAMBLING (1).

Le relargage par le sulfate d'ammonium permettra de séparer bon nombre d'entre elles ; dans les recherches que nous exposons ici nous n'envisagerons que les constituants azotés les plus importants.

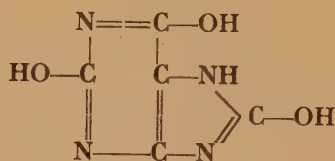
L'urée ne relargue pas même en solution aqueuse à 10 %.

L'acide urique, que l'on trouve à des doses voisines de 0 g. 50 par litre d'urine, relargue dans une certaine mesure, mais non intégralement. Ce relargage est d'ailleurs sans rapport direct avec la concentration absolue de l'acide urique dans l'urine.

Ainsi une urine contenant 0 g. 57 d'acide urique par litre en a laissé précipiter 0 g. 27 soit environ la moitié, alors qu'une autre plus riche, en contenant 0 g. 75 n'en abandonna que 0 g. 22 soit le tiers. (Les dosages ont été pratiqués selon la méthode de GRIGAUT (2) avant et après relargage, en tenant compte de l'augmentation de volume apportée par le sulfate d'ammonium dans ce dernier cas).

L'acide urique est pratiquement insoluble dans l'eau, et, dans l'urine, dès que l'on acidifie quelque peu, l'acide urique précipite spontanément. Dans l'urine normale, qui est légèrement acide, l'acide urique ne peut être en solution qu'à la faveur d'une substance hydrotropique ou d'une combinaison ou d'une absorption

avec un colloïde. Il ne semble pas que les substances hydrotropes éventuellement présentes dans l'urine, puissent expliquer cette solubilisation. L'agent de mise en solution de l'acide urique serait, d'après RANGIER (3), l'urochrome. L'acide urique serait, au moins en partie, combiné avec l'urochrome et, dans la combinaison, il prendrait la forme



Nous verrons plus loin que l'urochrome échappe au relargage. C'est peut-être à cause de sa combinaison avec l'urochrome que l'acide urique n'est que partiellement précipité par le sulfate d'ammonium et l'on a peut-être là le moyen de séparer les deux fractions de l'acide urique dont parle RANGIER. Il faudrait de nouvelles recherches que nous entreprendrons plus tard.

Des acides aminés existent sûrement dans l'urine, on les dose en bloc, mais leur nature nous est à peu près inconnue. Seul le glycocole y a été nettement caractérisé (4) (5) ; peut-être aussi l'histidine (6) et la cystine (7) (8), bien que la présence de cette dernière soit contestée (9) (10). Les analyses quantitatives ont montré, en gros, leur abondance plus grande chez les enfants que chez les grandes personnes. Le point de vue plus spécial de leur relargage a fait l'objet d'une étude de PFEIFFER et ANGERN (11). Pour ces auteurs le glycocole et la cystine relarguent, ils ne parlent pas de l'histidine. BLIX (12) n'a pu observer le relargage de la cystine par le sulfate d'ammonium.

Nous nous sommes contenté de rechercher l'histidine dans le relargat et il ne nous a pas été possible de la mettre en évidence par la réaction colorée de PAULY ; d'ailleurs une solution aqueuse de chlorhydrate d'histidine à 1 p. 100 ne précipite pas par saturation au sulfate d'ammonium.

Les dérivés des acides aminés sont nombreux dans l'urine. Nous laisserons de côté les dérivés de désamination, par exemple les acides p. oxyphénylacétique et p. oxyphénylpropionique que que BAUMANN (13) a trouvés à la dose de 10 à 20 mg. par litre soit libres (surtout), soit liés à l'acide sulfurique.

Au tryptophane se rattachent les dérivés indoliques et scato-

liques. L'indol libre ne se rencontre pas dans l'urine, mais on y trouve l'acide β indolacétique (qui a récemment retenu l'attention par son rôle d'auxine (14) (16), l'acide indol propionique (ou scatol acétique), l'acide indol carbonique. Puis, normalement, on y rencontre un peu d'un pigment mal défini le rouge scatolique, dérivé du scatol de nature inconnue et probablement de la série non encore décrite du triindylméthane (15) voisin de l'uroroséine (16) sinon identique (17), rapproché aussi de l'uroérythrine (18) et que l'on trouve encore, dans la littérature, sous les noms de purpurine, urohématine, pigment de Giacosa, pigment scatolique d'Otto.

Nous avons essayé de mettre en évidence dans le relargat les dérivés de l'indol et du scatol, aussi bien libres que conjugués à l'acide sulfurique au moyen des réactions classiques du nitrosoindol et de Jolles. Elles se sont montrées négatives.

D'autre part, une urine particulièrement riche en rouge scatolique (détermination spectroscopique) nous a montré que ce pigment n'est pas relargable.

De même la créatine, la créatinine, l'acide hippurique, l'histamine, que l'on peut trouver dans l'urine, ne figurent probablement pas dans le relargat. Nous avons en effet vérifié que des solutions aqueuses très concentrées de ces corps (1 p. 100 pour la créatinine et l'histamine, 0, 10 p. 100 pour l'acide hippurique) ne précipitent nullement lors de la saturation par le sulfate d'ammonium.

D'ailleurs la réaction de Pauly (traitement par un diazoréactif en milieu alcalin) pratiquée sur l'urine avant et après relargage, nous a montré que les dérivés imidazoliques ne sont pas précipités par le sulfate d'ammonium. Peut-être y a-t-il là un procédé de défécation à l'abri des reproches que signalent LESURE et THOMAS (19) et permettant de déterminer « l'indice de tyramine » dans les liquides biologiques.

La question des *pigments urinaires* normaux est encore fort embrouillée. Il est certain que le principal, l'urochrome de Tudi-chum et Garrod n'est pas un pigment unique. SCHUNTERMANN (20) trouve à côté de lui « l'urobiline, l'uroroséine et l'uroérythrine en quantités variables ». HEILMEYER et OTTO (21) donnent même des pourcentages : urobiline 1 % des pigments, uroérythrine 15 % et le reste se divisant en deux : 26 % à 40 % d'un urochrome A et 50 à 74 % d'un urochrome B. Or nous venons de voir d'une part l'identité probable de l'uroroséine et de l'uroérythrine et

d'autre part combien nos connaissances sont peu nettes à leur égard.

Pour ce qui est de l'urochrome, notre ignorance reste grande. H. FISCHER a établi qu'il vient des produits de décomposition des protides (22). DOMBROWSKI (23) (24) puis KLEMPERER (25), WEISS (26), MIWA (27), ont essayé d'en déterminer la nature. On sait que c'est un pigment azoté et soufré ; une partie du soufre est facilement détachable par les alcalis et une partie de l'azote est sous forme pyrrolique, mais sans parenté avec l'hémopyrrol. Si l'on ajoute que les acides le transforment partiellement en un pigment noir ou substance uromélanique on aura l'essentiel de nos connaissances sur ce sujet.

En ce qui nous concerne il est classique que l'urochrome reste en solution dans l'urine saturée par le sulfate d'ammonium. (GRIMBERT (28)). WEISS a récemment mis ce fait en évidence ; ni l'urochrome, ni son chromogène incolore l'urochromogène ne sont relargables par le sulfate d'ammonium. Les autres pigments ou chromogènes normaux, urobiline et urobilinogène relarguent, on le verra plus loin.

L. GAUTRELET (29) prétend qu'il en est de même pour l'uroérythrine ; nous n'avons pas eu l'occasion d'expérimenter sur des urines riches en uroérythrine ; nous avons cité plus haut une expérience qui montre qu'un composé voisin, le rouge scatolique, ne relargue pas.

En résumé, les composés azotés normaux les plus communs de l'urine se classent vis-à-vis du relargage par le sulfate d'ammonium de la façon suivante :

1° ne relarguant pas :

Urée, histidine, histamine, indol scatol et dérivés, créatine, acide hippurique, urochrome, urochromogène.

2° relarguant partiellement :

Acide urique.

3° intégralement précipitables :

Urobiline, urobilinogène et peut-être uroérythrine.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) E. LAMBLING, *Précis de biochimie*, 1911, p. 440.
- (2) GRIGAUT, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1922, 4, 14.
- (3) RANGIER, *J. Pharm. Chim.*, 1935, 22, 357.

- (4) L. PINCUSSEN, in *Oppenheimer Hand. d. Bioch.*, 2^e éd., 5, 509.
 - (5) E. ABDERHALDEN et A. SCHITTENHALM, *Z. physiol. Chem.*, 1906, 47, 339.
 - (6) R. ENGELAND, *Z. physiol. Chem.*, 1908, 57, 49.
 - (7) SALKOWSKI et LEUBE, *Z. physiol. Chem.*, 1883, 7, 225.
 - (8) GOLDMANN et BAUMANN, *Z. physiol. Méd.*, 1888, 12, 254.
 - (9) KULZ, *Sitzungsber. d. gesell. Z. Beförd. d. Ges. Naturwissenschaft. Z. Marburg*, 1875, 77.
 - (10) STADTHAGEN, *Z. physiol. chem.*, 1885, 9, 129.
 - (11) P. PFEIFFER et O. ANGERN, *Z. physiol. Chem.*, 1924, 133, 180.
 - (12) G. BLIX, *Z. physiol. Chem.*, 1928, 178, 109.
 - (13) BAUMANN, *Z. physiol. Chem.*, 1885, 10, 123.
 - (14) E. SALKOWSKI, *Z. physiol. Chem.*, 1884, 9, 8.
 - (15) A. ELLINGER et Cl. FLAMAND, *Z. physiol. Chem.*, 1909, 62, 276 ; 1911, 71, 7.
 - (16) C.-A. HERTER, *J. biol. Chem.*, 1908, 4, 239-253.
 - (17) Ch. PORCHER et Ch. HERVIEUX, *C. R.*, 1904, 138, 1726 ; *J. de phys. path.*, 1905, 7, 812 ; *Z. physiol. Chem.*, 1905, 45, 486.
 - (18) F.-A. HOPPE-SEYLER, *Oppenheimer, Hand. d. Bioch.*, 2^e éd., 1933, p. 225.
 - (19) A. LESURE et A. THOMAS, *Bull. Soc. Doct. en pharm.*, septembre-octobre 1936, p. 161.
 - (20) E. SCHUNTERMANN, *Beitr. Klin. Tuberk.*, 1928, 69, 438.
 - (21) L. HEILMEYER et W. OTTO, *Z. exp. Med.*, 1930, 74, 490.
 - (22) OPPENHEIMER, *Hand. d. Biochem.*, 1933, 2^e éd., p. 597.
 - (23) M.-S. DOMBROWSKI, *C. R.*, 1907, 145, 575.
 - (24) M.-S. DOMBROWSKI, *Z. physiol. Chem.*, 1909, 62, 358.
 - (25) KLEMPERER, *Ber. Klin. Woch.*, 1903, 314.
 - (26) M. WEISS, *Biochem., Z.*, 1922, 133, 331 ; 1922, 134, 269 ; *Erg. d. Inn. Med.*, 1922, 22, 139.
 - (27) MIWA, *Klin. Woch.*, novembre 1935, p. 1665.
 - (28) J. GUIART et L. GRIMBERT, *Diagnostic chimique, microscopique et parasitologique*, Paris 1922, p. 783.
 - (29) L. Cl. E. GAUTRELET, *Thèse doctorat Pharmacie*, Paris 1900, p. 36.
-

CHAPITRE SECOND

Substances non azotées de l'urine normale

Glucides

L'urine normale possède un certain pouvoir réducteur attribué à des substances dextrogyres (1) (2), inconnues pour la plupart, et dont SCHÖNDORFF (3) estime la proportion à 0 g. 10, 0 g. 20 par litre (exprimées en glucose). L'acide glycuronique et peut-être le glucose y ont été décelés.

Ces substances ne sont vraisemblablement pas relargables, nous avons pu vérifier le fait pour l'*acide glycuronique* et ses conjugués en pratiquant la réaction classique de la naphtoré-sorcine sur le relargat d'une urine recueillie après absorption de camphre (pour augmenter la teneur en dérivés glycuroniques). Il est en outre manifeste qu'une solution de glucose ou de lévulose ne précipite pas par saturation au sulfate d'ammonium.

Relargage des acides organiques

Un certain nombre d'acides ont été caractérisés dans l'urine : formique (CAMPBELL (4), BULIGINSKI (5)), acétique (PROUST (5)), propionique (SALKOWSKI (7)), butyrique (BERZELIUS (8), KLING

(9)), MAGNUS-LEVY (16) estime à 60 mg. la quantité d'acide acétique journellement éliminée et ROSENFELD (10) en trouve 4 à 8 fois plus. Nous n'en avons pas fait la recherche sur le relargat. Mais, en solution aqueuse, la série des acides normaux libres présente nettement, à partir du terme en C_3 le phénomène du relargage. Il en est probablement de même dans l'urine, et des esters peuvent les accompagner dans leur précipitation. C'est du moins une explication que nous proposons à l'accentuation de l'odeur de l'urine lorsqu'on la sature de sulfate d'ammonium.

Outre ces acides purement « gras », il en est d'autres dont la présence a été reconnue dans l'urine. Citons les acides lactique (10) (18), oxalique, succinique, glyoxylique. Un certain nombre de phénols (19) figurent aussi dans l'urine normale, à des taux variant suivant les auteurs de 0 g. 018 — 0 g. 052 pour cent (20) à 0 g. 17 pour cent (21). Nous n'avons pas recherché ces composés dans le relargat mais nous pouvons faire remarquer que le relargage des phénols est un fait classique.

Relargage des lipides

Les esters des acides que nous venons de mentionner forment une partie importante des lipides urinaires que divers auteurs ont étudiés. La méthode d'extraction consiste en un épuisement à l'éther ou une absorption sur du plâtre suivie d'un lavage de ce dernier à l'aide d'un solvant volatil. Les graisses sont ensuite dosées dans le résidu d'évaporation du solvant (L. PINCUSSEN (11)).

FOERBER (12) a montré que, si l'urine des enfants est dépourvue de lipides, l'urine des adultes en contient un peu et celle de chien plus encore. SAKAGUCHI (13) trouve en moyenne 0 g. 0085 chez l'adulte alors que Von BRONKHORST (14) et ses collaborateurs donnent le chiffre beaucoup plus élevé de 0 g. 150 par jour. Ces derniers auteurs voient d'ailleurs, chez les amaigris, le chiffre tomber à 2-3 mg. Dans les cas pathologiques que PINCUSSEN divise en deux groupes, lipurie et chylurie (à la suite des travaux de KOBERT (15) et MAGNUS-LÉVY (16)), de même d'ailleurs que dans l'acidose, BRICE (17) voit doubler la quantité de lipides.

Il est très vraisemblable que les substances grasses relarguent, mais nos recherches n'ont pas porté sur les lipides en

général ; nous nous sommes intéressé à une fraction bien déterminée : le cholestérol.

Le cholestérol

Parmi les constituants lipidiques de l'organisme, le cholestérol et ses esters jouent un rôle obscur encore, mais dont l'intérêt s'accroît de jour en jour.

L'élimination urinaire en est particulièrement faible. C'est en 1902 que KAISERLING (22) signale des substances biréfringentes dans certaines urines pathologiques. Mais c'est GÉRARD (23) qui le premier identifie le cholestérol et obtient 11 mg. de ce composé à partir de 70 l. 9 d'urine. Puis différents auteurs le retrouvent. Citons F. MUNK (24), BACMEISTER (25), PRIBRAM (26), MARY E. TARNER (28), FALK (27).

Mais l'intérêt de cette recherche n'est apparu vraiment qu'avec les travaux de DORNER (29) qui trouve une forte cholestérolurie chez une opérée d'un calcul urinaire et de GRUNKE (30) qui montre dans quelques cas une exagération de cette élimination dans l'urine des diabétiques et des ictériques.

La complexité et la difficulté des techniques proposées ne permettaient pas toutefois une étude systématique de cette élimination. Citons par exemple le procédé de GÉRARD, le premier en date (23).

Il agite à plusieurs reprises l'urine avec de l'éther. Les solutions éthérées sont distillées et le résidu, desséché, est repris par l'éther anhydre. Les liqueurs éthérées sont évaporées à sec. 70 l. 910 d'urine conduisent ainsi à 0 g. 544 d'un extrait poisseux. On procède ensuite à une saponification de cet extrait au moyen de la potasse alcoolique. Puis on élimine la potasse de la solution au moyen d'un courant de gaz carbonique (le carbonate de potassium formé est insoluble dans l'alcool) et évapore la solution filtrée. Le résidu bien sec est repris par l'éther anhydre qui enlève 0 g. 11 de cholestérol impur ayant la forme d'une masse cireuse à partir de laquelle, par épuisement au méthanol contenant 20 p. 100 d'eau, il a pu obtenir quelques petits cristaux caractéristiques de cholestérol.

GARDNER (18) concentre d'abord fortement l'urine puis, après addition de 2 p. 100 de lessive de soude, il épuise la masse au moyen de l'éther pendant cinq jours (agitation le jour et repos la nuit pour permettre au mieux la séparation des phases). Le

résidu d'évaporation de l'éther est ensuite saponifié par la soude alcoolique et le cholestérol estimé par précipitation au digitogenoside selon la méthode de FRAZER et GARDNER (31), modification de celle de WINDAUS (32).

On a quelques fois substitué au dosage pondéral une approximation colorimétrique. FEIGL (33) et FEX (34) ont discuté leurs valeurs réciproques et, après eux, GRUNKE (30) a repris leur application à l'urine (dans un article auquel nous renvoyons pour plus de détails).

Parmi les auteurs qui se sont intéressés à ce dosage, citons encore : SCHMIDT (35), CONDORELLI (36), MIRSKY (37), Maurice BRUGER (38), Jens BING et Ulrik STARUP (39), Jens BING (40), A. KNUDSON (41), GROSS (42).

Le point délicat de toutes ces techniques réside dans le mode d'extraction du cholestérol de l'urine. Il est évident que l'extraction par agitation avec de l'éther, des traces de cholestérol que contient l'urine normale est chose peu aisée, quand bien même on est favorisé par le coefficient de partage. Lorsqu'on procède à une forte concentration préalable en s'aidant de la chaleur il est bien probable que ce n'est pas sans risques pour le produit que l'on se propose de doser. Une concentration de l'urine par évaporation dans le vide sulfurique par exemple, n'aurait pas cet inconvénient. Nous devons enfin faire remarquer la facilité avec laquelle l'urine, et plus encore l'urine après concentration, peut donner avec les solvants volatils et particulièrement avec l'éther, des émulsions fort stables.

RECHERCHES PERSONNELLES

Pour doser le cholestérol dans l'urine humaine, nous avons donc renoncé aux méthodes d'extraction précédentes et nous avons essayé d'adapter la méthode du relargage plus apte à une séparation rapide, intégrale et sans altération du cholestérol. Un essai qualitatif nous a montré que le cholestérol figurait dans le relargat et que la précipitation par le sulfate d'ammonium est totale (en extrayant le filtrat plusieurs fois au moyen de l'éther, nous n'avons pu en retirer la moindre trace). Passant aux essais quantitatifs nous avons adopté la technique suivante. Un grand volume d'urine (deux à trois litres si possible) est saturé de sulfate d'ammonium. La solution est ensuite filtrée à froid sur papier avec l'aide d'une trompe à eau.

Le relargat obtenu est desséché dans le vide puis saponifié par 50 cm³ de soude alcoolique à 4 p. 100 pendant 6 heures au réfrigérant à reflux. La solution alcoolique est évaporée avec l'éther qui a servi à laver le résidu de saponification. On obtient un résidu sec (ou plutôt légèrement pâteux) que l'on triture avec quelques grammes de sulfate de sodium anhydre et épuise pendant 12 heures dans la cartouche d'un Kumagawa au moyen de l'éther de pétrole.

Cette solution étherée, évaporée à sec, abandonne un résidu à peine coloré où le microscope permet de déceler des cristaux de cholestérol.

Après reprise au moyen de 15 cm³ d'éthanol à 95°, on précipite ce cholestérol au moyen du digitonoside en solution chaude à 1 p. 100 dans l'éthanol selon la technique de WINDAUS.

Le précipité complexe est séparé par filtration, lavé à l'alcool puis épuisé au xylol bouillant pendant une demi-heure au réfrigérant à reflux. Enfin, la solution séparée par filtration abandonne par évaporation un résidu de cholestérol qui peut être pesé ou estimé par colorimétrie selon les méthodes classiques.

Les diverses étapes de purification par épuisement à l'éther de pétrole, précipitation au moyen du digitonoside puis extraction au xylol sont indispensables pour éliminer un pigment urinaire jaune qui interdirait toute comparaison colorimétrique et que le procédé de Grunke à la chaux (*) ne nous permettait pas d'éliminer complètement.

Pour obtenir de beaux cristaux de cholestérol il est nécessaire de les reprendre par l'alcool et d'abandonner la solution à l'évaporation spontanée.

Les divers auteurs trouvent une cholestérolurie quotidienne normale dont le taux varie quelque peu suivant les techniques utilisées.

0 mg 23 par litre pour GÉRARD,

0 mg 5 par jour pour BRUGER,

environ 1 mg par jour pour GRUNKE (colorimétrie),

1 à 4 mg par jour pour GARDNER (dosage pondéral),

3 à 4 mg par litre pour MIRSKY.

(*) Grunke, pour éliminer la teinte brune parasite de l'extractum urinaire, extrait le cholestérol au moyen du chloroforme en présence de chaux, la substance colorée de nature inconnue, étant « précipitée » par la chaux.

Toutefois, Condorelli en trouve 15 mg.

Pour les cas pathologiques, citons quelques chiffres :

De GRUNKE :

10 mg par jour dans la cholélithiase,

13 mg par jour dans le diabète,

10 mg par jour dans une urine ictérique (cette forte teneur n'étant pas constante d'après l'auteur) ;

De SANO :

200 mg par litre d'urine dans un cas de chylurie ;

De MIRSKY :

de 20 à 45 mg par litre dans un cas de glomérulonephrite chronique diffuse ;

De BRUGER :

de 2,5 à 92 mg par jour dans la maladie de Bright.

Personnellement, nous avons trouvé :

0,6 à 1 mg par litre dans les urines normales,

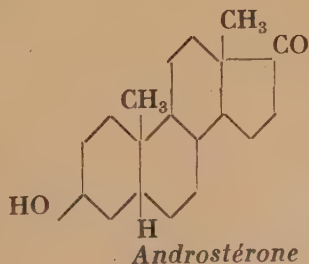
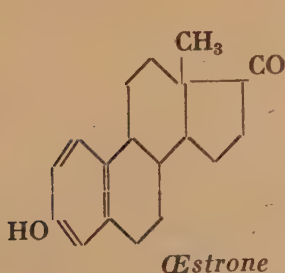
8,5 à 10 mg par litre dans un cas de diabète équilibré (urine dépourvue de glucose),

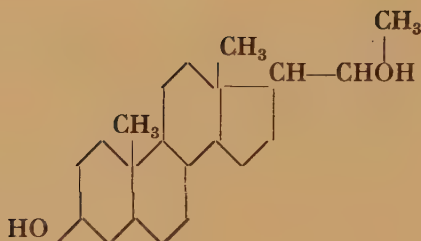
des traces non dosables dans une urine ictérique.

La présence de 10 mg de cholestérol par litre d'urine diabétique pose d'ailleurs un problème que nous ne pouvons examiner ici, le cholestérol étant pratiquement insoluble dans une urine normale parce que celle-ci ne contient pas les substances qui dans le sérum ou la bile entraînent en solution les stérols et les lipides en général.

Hormones

On sait que les hormones sexuelles se rencontrent dans l'urine, c'est même la seule ou la principale matière première pour la plupart d'entre elles (43). L'analogie de leur structure chimique avec celles du cholestérol ou des acides biliaires





Pregnandiol

rendait particulièrement intéressante leur recherche dans le relargat où nous avons pu déceler l'œstrone.

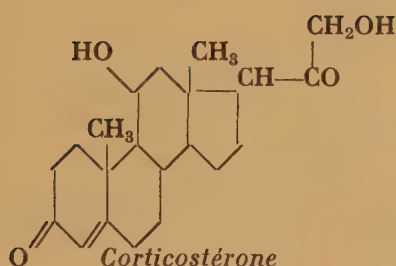
Pour cela, nous avons épuisé au moyen de l'alcool les relargats d'urines de femmes enceintes. L'extrait alcoolique abandonnait à l'évaporation, un résidu que nous avons dissous dans l'eau. Nous avons ainsi préparé les solutions aqueuses de relargat de deux urines différentes :

- a) un centimètre cube de solution correspondant à 6 cm³ de la première urine ;
 - b) un cm³ correspondant à 10 cm³ de la seconde urine.
- Ces solutions aqueuses ont été injectées à des lots de rates castrées (17 à 18 en tout), par doses croissantes.

On a constaté que 3 à 4 cm³ de a) et 7 cm³ 5 de b) ont provoqué l'œstrus dans les 24 heures (*).

D'autres agents hormonaux ont été décelés dans l'urine par des méthodes plus ou moins laborieuses. Citons l'hormone cortico surrénale que GROLLMANN (44) met en évidence alors que MEIO (45) ne peut la trouver ; l'activateur Z d'EULER (46), le prolan A (GOSTIMIROVIC (47)). Dans aucun cas, semble-t-il, ces auteurs n'ont eu recours au relargage. Il est pourtant vraisemblable, d'après le peu qu'on sait de la constitution de certaines de ces substances et en particulier de la corticostérone (REICHSTEIN (47 bis)).

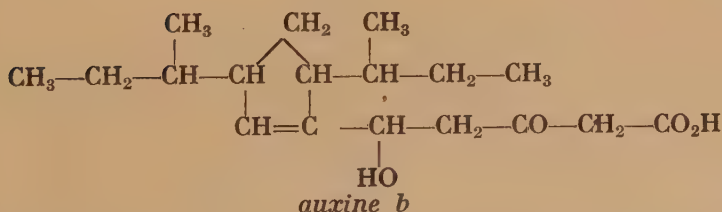
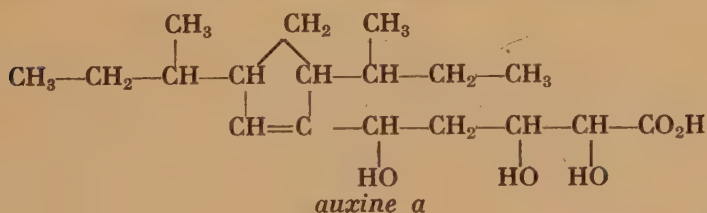
(*) Nous remercions vivement M. L. Cuny qui a bien voulu se charger de ces essais physiologiques.



qu'elles sont susceptibles d'être précipitées par le sulfate d'ammonium. Le relargage conduirait probablement à des simplifications dans leur mode d'extraction. Il offre déjà l'avantage d'écarter les chances d'hydrolyse, d'oxydation, et de toutes les altérations qu'entraînent inévitablement des agitations et des chauffages répétés avec des solvants.

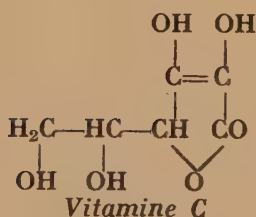
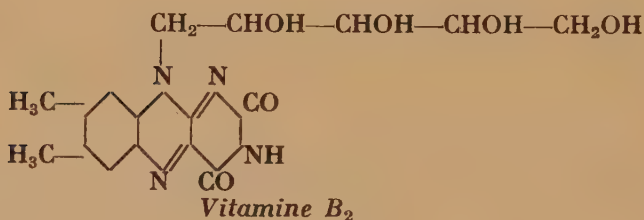
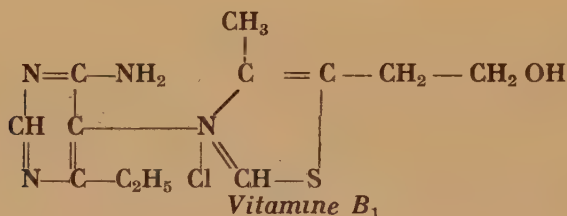
Auxines - Vitamines

KOEGL (48) a mis récemment en évidence dans l'urine humaine les auxines, facteurs de croissance végétaux



Si nous n'avons pu les rechercher dans le relargat, nous pouvons cependant penser qu'elles y figurent en raison de leur poids moléculaire élevé, des nombreuses ramifications de leur squelette carboné et du petit nombre de leurs groupements hydrophiles.

Parmi tous les infiniment petits chimiques indispensables au métabolisme cellulaire dont l'urine évacue l'excès ou les produits de dégradation, citons les vitamines B₁ et B₂ (nous les classons dans le sous-chapitre vitamines, bien qu'on trouve de l'azote dans leur molécule), que LESLIE, J. HARRIS et P. LEONG (84), puis A. EMMERIE (85) et MARGARET H. ROSCOE (86) ont mises en évidence et la vitamine C dont la présence dans l'urine est aujourd'hui classique.



L'examen de ces formules suffit à montrer que les vitamines B₁ et B₂ doivent être relarguées par le sulfate d'ammonium, tandis que la vitamine C pourvue de nombreux groupes hydrophiles, ne doit pas précipiter. Nous l'avons vérifié pour cette dernière : une solution aqueuse d'acide ascorbique à 1 g pour 1000 n'est pas relargable.

COMPOSES HORS GROUPE

Sous ce titre, nous réunirons un certain nombre de composés dont la nature chimique nous est inconnue et qui ont été caractérisés dans l'urine. Parmi eux citons l'antitoxine diphtérique (NEILL (49)), certains anticorps (PASTEUR VALLERY RADOT (50)), et en particulier un anticorps hémolytique (CONDORELLI (51)), des antisérums (TOKUNOYAMA (52)), l'insuline que Partos (53) prétend déceler alors que UBERRACK (54) puis LAURENCE (55) ne la retrouvent pas, une substance antianémique (LEINER (56)). Ces substances relarguent-elles ? Nous n'avons pas cherché à le préciser, mais c'est vraisemblable ; c'est d'ailleurs le procédé qu'utilisa CONDORELLI pour isoler son anticorps hémolytique.

Relargage des enzymes urinaires

A côté de ce groupe, un champ bien plus vaste s'ouvre avec les enzymes que l'on a pu déceler en foule dans l'urine. Le premier BRUCKE en 1860 signale un ferment digérant la fibrine. FIELD et HIRAYAMA (58), puis GOTTLIEB (59), pensent à une propepsine qu'une acidification transformerait en pepsine. D'ailleurs, MATHES (60), GROBER (61), BRODZKI (72), BENFEY (63), WILENKO (64), trouvent la pepsine elle-même.

La trypsine ne semble pas se rencontrer dans l'urine normale (62) pourtant HEDIN (66) affirme qu'il sépare par dialyse une trypsine des urines normales alors que les urines pathologiques lui donneraient de la pepsine. BOAS (67) discute de la présence d'une pepsine. L'amylase, découverte à la même époque par CONHEIM (68) et BECHAMPS (69) est retrouvée par GEHRIG (70), HOLOVISCHINER (71), LOEPER et FICAI (72), WOHLGEMUTH (73), FALK (74), ECKARDT (75), COHEN (76). LOEPER et FICAI (77), décèlent la lipase, DMOCHOWSKI (78) (79) une glycérophosphatase, (mais dans quelques cas seulement), de même que KUTSCHER (80) ; F. DEMUTH (81) une hexosediphosphatase, et WALDSCHMIDT (82) deux phosphatases. Saccharase, lactase, maltase (83), ont pu être décelées, mais, seulement, semble-t-il, lors de l'absorption des glucides correspondants.

Bref, de nombreux enzymes se trouvent habituellement dans l'urine. On connaît d'autre part leur propriété d'être relargués par les sels neutres. Parmi ces substances, nous n'avons recherché dans le relargat que l'amylase et la glycérophosphatase et

toujours nous avons pu les caractériser nettement. La solution aqueuse de ce relargat bien qu'elle fut neutre, hydrolysait fortement l'amidon et le glycérphosphate de sodium alors que le filtrat se montrait dépourvu des mêmes propriétés. Nulle action empêchante du sulfate d'ammonium ne pouvant d'ailleurs être évoquée à ce sujet ainsi qu'une expérience témoin a pu nous le montrer (le témoin, fait d'urine saturée de sulfate d'ammonium et non filtrée, avait la même activité diastasique que la solution du relargat provenant d'un même volume d'urine). C'est à-dire que la précipitation de ces enzymes est quantitative.

En résumé, parmi toutes les substances non azotées ou hors groupe dont la présence a été reconnue dans l'urine normale, certaines doivent échapper au relargage par le sulfate d'ammonium (glucides, acide ascorbique); nous avons indiqué celles paraissant susceptibles de précipiter et nous avons appliqué la méthode du relargage à l'extraction pour dosage du cholestérol urinaire et à la caractérisation de l'œtrone, de l'amylase, de la glycérphosphatase; cette méthode paraît ici susceptible d'une large extension.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) F. MORITZ, *D. Arch. klin. Med.*, 1890, 46, 217.
- (2) K. BAISCH, *Z. physiol. Chem.*, 1894, 19, 339.
- (3) B. SCHONDORFF, *Pflügers Arch. ges. Phys.*, 1908, 121, 572.
- (4) D. CAMPBELL, *J. für prakt. Chem.*, 1853, 60, 255.
- (5) A. BULIGINSKI, *Hoppe Seyler's med. Chem. Unt.*, 1866, 234, 240.
- (6) PROUST, *Ann. de chim. phys.*, 1800, 36, cité par Huppert.
- (7) SALKOWSKI, *Pflügers arch. ges. Phys.*, 1869, 2, 351.
- (8) J. BERZELIUS, *Lehrb. d. Chem.*, 1840, 9, 424.
- (9) L. KLINC, *Bull. Soc. Chi. Bio.*, 1935, 17, 1540.
- (10) ROSENFELD, cité in Oppenheimer 1925, 2^e éd. V., p. 573.
- (10 bis) E. HEUSS, *Arch. f. exp. Pathol.*, 1890, 26, 147.
- (11) L. PINCUSSEN, in Oppenheimer *Hand. d. Bioch.*, 1925, 5, 569.
- (12) E. FOERBER, *Z. physiol. Chem.*, 1926, 154, 302.
- (13) K. SAKAGUCHI, *Biochem. Z.*, 1913, 48, 1.
- (14) A.-J. VAN BRONKHORST, E. DINGEMAUZE, J. FREND et A. VAN HERWERDEN, *Ned. Tijdschr. Geneesk.*, 1931, 2, 5959.
- (15) R. KOBERT, *Schmidt's Jahresb.*, 1881, 189, 1.
- (16) A. MAGNUS-LÉVY, *Zeit. klin. med.*, 1908, 66, 482.
- (17) A.-T. BRICE JR., *J. of. lab. clin.*, 1930, 15, 953.
- (18) J.-A. GARDNER et H. GAINSBOROUGH, *Biochem. J.*, 1926, 19, 667.

- (19) L. CONDORELLI, *Policlin, Sez. Prat.*, 1926, 33, 796.
(20) F. KOGL, *Z. physiol. Chem.*, 1933, 214, 241.
(21) O. FURTH et R. SCHOLL, *Biochem. Z.*, 1931, 243, 274.
(22) KAISERLING ORGLER, *Arch. path. Anat. Physiol.*, 1902, 167, 296.
(23) GÉRARD, *C. R. Soc. Biol.*, 1911, 70, 998.
(24) F. MUNK, *Z. Klin. Med.*, 1913, 78, 1.
(25) BACMEISTER et HAVERS, *Deut. med. Woch.*, 1914, 40, 385.
(26) PRIBRAM, *Biochem. Z.*, 1901, 1, 413.
(27) FALK et SIEBENROCK, *Med. Klin.*, 1911, 7, 739.
(28) MARY E. TURNER, *J. Biol. Chem.*, 1933, 100, 91.
(29) G. DORNER, *Münch. med. Woch.*, 1922, 661.
(30) GRUNKE, *Biochem. Z.*, 1922, 132, 543.
(31) FRAZER et GARDNER, *Proc. roy. soc. London*, 1910, 82, 559.
(32) WINDAUS, *Z. physiol. Chem.*, 1910, 65, 110 ; *Ber. deutsch. Chem. Ges.*, 1909, 42, 5238.
(33) FEIGL, *Z. f. d. ges. exp. Med.*, 1920, 11, 178.
(34) FEX, *Biochem. Z.*, 1920, 104, 82.
(35) SCHMIDT, *Pharm. Chim.*, 2, 1, 930.
(36) L. CONDORELLI, *Policlin. Sez. Prat.*, 1926, 33, 796.
(37) I.-A. MIRSKY, *J. of. lab. clin.*, 1933, 18, 1068.
(38) Maurice BRUGER, *Am. J. clin. Path.*, 1935, 5, 504.
(39) JENS BING et ULRICK STARUP, *Acta. Med. Skand.*, 1935, 86, 12.
(40) JENS BING, *Acta Med. Skand.*, 1936, *Supplément*, p. 151.
(41) A. KNUDSON, Th. ORDWAY et H. FERGUSSON, *Proc. Soc. exp. Biol. a. med.*, 1921, 18, 299.
(42) GROSS, *Verh. dtsch. ges. Inn. Med.*, 1921, 343.
(43) R. DELABY, *J. Pharm. Chim.*, 1937, 8^e sér., 26, 136.
(44) GROLLMANN Arthur et W.-M. FIROR, *Proc. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1933, 30, 669.
(45) R.-H. DE MEIO et Y.-T. LEWIS, *Rev. Soc. Argentina, Biol.*, 1933, 9, 113 ; *C. R. Soc. Biol.*, 1933, 114, 401.
(46) Hans EULER et Tore PHILIPSON, *Biochem. Z.*, 1932, 249, 245.
(47) GOSTIMIROVIC D., *Zentralblatt Gynäkol.*, 1933, 57, 2476.
(47 bis) REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, décembre 1937.
(48) F. KÖGL, *Z. physiol. Chem.*, 1933, 214, 241.
(49) J.-M. NEILL, *J. of. Imm.*, 1931, 20, 347.
(50) PASTEUR VALLERY RADOT, *C. R. Soc. Biol.*, 1931, 108, 952.
(51) L. CONDORELLI, *Policlin, Sez. Prat.*, 1920, 27, 527.
(52) J. TOKUNOYAMA, TOHOKU, *J. exp. Méd.*, 1931, 17, 293.
(53) A. PARTOS, *Pflüger's Arch. Ges. Phys.*, 1929, 221, 562.
(54) K. ÜBERRACK et F. ZELL, *Biochem. Z.*, 1931, 239, 42.
(55) R.-D. LAWRENCE, *Brit. J. exp. path.*, 1930, 11, 117.
(56) G. LEINER, *Wien Klin. Woch.*, 1935, 48, 559.
(58) E. FULD et K. HIRAYAMA, *Ber. Klin. Woch.*, 1910, 1062.

- (59) E. GOTTLIEB, *Skan. arch. phsiol.*, 1924, 46, 1.
(60) M. MATHES, *Arch. J. exp. Pathol. und Pharmac.*, 1903, 49, 107.
(61) J.-A. GROBER, *Dtsch. arch. f. Klin. Med.*, 1904, 79, 443.
(62) J. BRODZKI, *Z. Klin. Med.*, 1907, 63, 537.
(63) A. BENFEY, *Biochem. Z.*, 1908, 10, 458.
(64) G.-G. WILENKO, *Ber. Klin. Woch.*, 1908, 45, 1060.
(66) S.-G. HEDIN, *Z. physiol. Chem.*, 1921, 122, 252.
(67) J. BOAS, *Z. Klin. Med.*, 1888, 14, 249.
(68) J. CONHEIM, *Virchows Arch.*, 1865, 28, 241.
(69) A. BECHAMPS, *C. R.*, 1865, 60, 445.
(70) F. GEHRIG, *Arch. J. Gesell. Physiol.*, 1886, 38, 35.
(71) E. HOLOVITSCHINER, *Virchows Archiv.*, 1886, 104, 42.
(72) LOEPER et FICAI, *C. R. Soc. Biol.*, 1907, 52, 1018 ; 1907, 63, 266.
(73) J. WOHLGEMUTH, *Biochem. Z.*, 1909, 21, 432.
(74) FR. FALK et SKOLIER., *Z. f. Klin. Med.*, 1909, 68, 156.
(75) F. ECKARDT, *Deut. Arch. Klin. Med.*, 1935 ; 177, 517.
(76) I. COHEN, *Biochem. J.*, 1926, 30, 253.
(77) LOEPER et FICAI, *C. R. Soc. Biol.*, 1907, 62, 1032.
(78) A. DMOCHOWSKI, *C. R. Soc. Biol.*, 1933, 113, 956.
(79) A. DMOCHOWSKI et D. ASSENHAJM, *Naturwiss*, 1935, 23, 501.
(80) Waldemar KUTSCHER, *Z. physiol. Chem.*, 1935, 235, 62.
(80 bis) W. KUTSCHER et Hajo WOLBERGS, *Naturwiss*, 1935, 23, 558.
(81) F. DEMUTH, *Biochem. Z.*, 1925, 166, 162.
(82) E. WALDSCHMIDT, LEITZ et W. NONNENBRUCH, *Naturwiss*, 1935, 23, 164.
(83) TAKEZO KOKURYO JAPAN, *J. Med. Sci.*, 1933, 2, 175.
(84) Leslie J. HARRIS et P.-C. LEONG, *Lancet*, 1936, 1, 886.
(85) A. EMMERIE, *Nature*, 1936, 138, 164.
(86) Margaret H. ROSCOE, *Biochem. J.*, 1936, 30, 1053.
-

TROISIEME PARTIE

APPLICATION DU RELARGAGE A L'ETUDE DES ELIMINATIONS URINAIRES PATHOLOGIQUES

Pour être complète, l'étude de l'élimination urinaire par la méthode du relargage devait comporter une autre partie, celle des substances que l'on ne rencontre qu'accidentellement dans l'urine et que nous avons groupées sous la rubrique « urines pathologiques ».

Le champ est ici très vaste; nous nous sommes encore borné à quelques cas choisis.

CHAPITRE PREMIER

SUBSTANCES D'ORIGINE PUREMENT ENDOGENE

A. Glucides et dérivés

Les urines diabétiques n'ont pas retenu notre attention ; le glucose, pas plus que l'acide β oxybutyrique (1) ne relarguent. Nous croyons utile de rappeler ici que dans ces urines on peut mettre en évidence l'augmentation surprenante d'une substance qui relargue, le cholestérol ; nous avons étudié ce point dans un autre chapitre. (Cf. page 32.)

B. Protides

Les substances protéiques éliminées par l'urine sont habituellement les « albumines », assez variées d'ailleurs ; mais on sait qu'albumoses et peptones ont pu y être mises en évidence.

Leur comportement vis-à-vis de la saturation, par le sulfate d'ammonium, et les sels neutres, est connu et utilisé depuis bien longtemps. Le manuel de GRIMBERT auquel nous renvoyons pour ne pas alourdir notre bibliographie, adopte deux techniques de dosage qui font appel au relargage (1 bis).

C. Pigments anormaux - Substances biliaires de l'urine

Nous avons déjà signalé nos observations sur le *rouge scatolique* (Cf. page 24). Ce pigment ne relargue pas, car la couleur de notre urine n'est pas diminuée par saturation au sulfate d'ammonium. Le pigment mélanique ne relargue pas, d'après MÉHU (62 bis), tandis que LANDOLT (140) utilise cette méthode pour son isolement.

Nous nous étendrons plus longuement sur les urines ictériques. Ces urines sont essentiellement caractérisées par leur forte coloration due à la *bilirubine*, mais ce pigment n'est pas le seul élément biliaire qui reflète les troubles hépatiques.

Parmi les constituants de la bile, ceux que l'on peut rencontrer dans l'urine sont essentiellement .

le cholestérol ;

les acides biliaires ;

les pigments biliaires (bilirubine, urobiline).

Le *cholestérol* a fait l'objet d'un paragraphe spécial (cf. page 32) et nous rappelons qu'il existe normalement dans l'urine.

Les *acides biliaires* relarguent très facilement ; leur caractérisation et leur dosage dans l'urine normale et pathologique feront l'objet d'un travail de thèse de notre camarade Pierre BLONDE. Nous ne ferons que les mentionner.

LES PIGMENTS BILIAIRES

Une opposition apparaît tout de suite entre les deux principaux éléments de la cholurie : sels et pigments biliaires. Dans une urine ictérique, on peut trouver des quantités énormes de bilirubine, alors que les quantités de sels biliaires restent toujours modestes. Aussi est-ce le plus souvent à la recherche des pigments que l'on s'adresse pour caractériser l'ictère.

En vérité, à la période critique de l'ictère, cette recherche s'avère inutile, la couleur de l'urine, et plus encore de la peau et des conjonctives sont suffisamment explicites. Il n'en est pas de même au début de l'ictère et dans les troubles hépatiques légers. La caractérisation de la bilirubine retrouve alors son intérêt.

Les recherches qualitatives auxquelles on se tient en fait, dans la pratique du laboratoire, ne permettent pas de suivre l'ictère et d'aider le pronostic. Enfin, il se produit, lors de la

deffervescence de l'ictère, une mutation de pigments qui fait qu'une urine très foncée peut laisser croire à une persistance de l'ictère, alors qu'on est à la veille de sa disparition.

Pour toutes ces raisons, nous nous sommes attaché à doser de façon aussi simple que possible le pigment essentiel de l'ictère, nous voulons dire la bilirubine.

Mais une question préalable doit être résolue. La bilirubine existe-t-elle dans l'urine normale ?

I. BILIRUBINE

Vossius (2) le premier la signala dans l'urine de chien. Nous avons pu nous-même la mettre en évidence soit par oxydation à l'acide nitrique nitreux, soit par le procédé que nous avons adopté finalement.

L'urine de cobaye ne semble pas contenir de bilirubine. Dans la bile même de cet animal, nous n'avons pu la caractériser ni par transformation en biliverdine, ni par azoréaction.

Dans l'urine humaine, OBERMAYER et POPPER (2 bis), puis AUCHÉ (3) ont prétendu en trouver. E. A. MOLINELLI et M. ROYER (5) apportent une conclusion contraire. Il convient de noter que, chez le nouveau-né, les résultats peuvent être différents. L'enfant qui vient de naître a très souvent un ictère léger BIFFI et P. GALLI (4) ont pu déceler la bilirubine dans l'urine recueillie pendant les jours qui suivent la naissance et ils ont vu son taux augmenter jusqu'au quatrième jour pour diminuer ensuite jusqu'à la troisième semaine.

Personnellement, dans l'urine d'adulte, nous n'avons jamais pu la mettre en évidence par oxydation à la tochlorine ou par azoréaction, même après relargage de fortes quantités d'urine selon les procédés qui seront décrits plus loin.

Pour les urines pathologiques, les procédés de recherche et de dosage abondent. Avant d'exposer la méthode que nous avons adoptée, nous examinerons successivement les nombreux moyens employés jusqu'ici pour la caractérisation et la détermination de la bilirubine ; la littérature sur cette question est énorme et nous nous garderons bien de la rapporter avec quelques détails ; nous croyons cependant devoir mentionner tous les mémoires qui s'y rapportent pour faciliter le travail des spécialistes de la question ; nous les classons dans un cadre qui, croyons-nous, met en relief l'essentiel.

1° METHODES QUALITATIVES

Quatre moyens sont à la base de l'infinie variété des techniques :

Spectroscopie ;

Colorimétrie :

réaction de la biliverdine (oxydation)

réaction de l'azobilirubine (azoréaction) ;

Méthodes indirectes.

a) Méthodes spectroscopiques

Elles sont basées sur la propriété physique que possède la bilirubine de donner une bande très foncée dans le rouge entre B et C. Différentes méthodes ont été publiées par : FUDAKOWSKI (6), QUICKLAY (7) R. V. ZEYNEK (8), PARMENTIER (9), AUCHÉ (10), SHEARD, MANN BOLLMANN (11), SHEARD, BALDES, MANN, BOLMANN (12).

b) Méthodes par oxydation

L'oxydation de la bilirubine conduit en premier lieu à la biliverdine. Mais, si l'on emploie des oxydants énergiques, ce premier stade vert est dépassé et on obtient le beau jeu de couleurs de la réaction de Gmelin : bleu, violet, rouge et enfin jaune, dont Hans FISCHER a récemment exposé le mécanisme (13).

C'est sur l'apparition de cette teinte verte ou quelquefois de la teinte bleue (14) que reposent les divers procédés de recherche que nous avons pu réunir ci-dessous.

Ils s'effectuent sur l'urine telle quelle ou bien sur un précipité enrichi de bilirubine.

α SUR L'URINE EN NATURE

On a choisi des oxydants très variés :

1° Acide nitrique fumant seul :

TIEDMANN et GMELIN (15), ROSENBACH (16), DRAGENDORFF (17), PRESSLICH (18).

2° Acide nitrique, concentration de l'urine et addition d'acide sulfurique :

BRUCKE (19).

3° *Nitrite de sodium et acide sulfurique :*

FLEICHL (20), VON SPALITTA (21), VITALI (22), PRESS-
LICH (18), HALBERKANN et REICHE (23).

4° *Acide chromique ou bichromate de potassium :*

ROSENBACH (24), BIFFI (25).

5° *Nitrite de sodium :*

VITALI (22), MASSET (26), KLEHBIEL (27), ULTMANN (28),
PRESSLICH (18), HALBERKANN et REICHE (23), GIL-
BERT, HERSCHER et POSTERNACK (29), DHÉRÉ (30),
STÉENSMA (31), J. GLASS (32).

6° *Iode.*

TROUSSEAU et DUMONT-PALLIER (33), MARÉCHAL (34), W.
G. SMITH (35), KATHREIN (36), H. ROSIN (37), LE
NOBEL (38), OBERMAYER et POPPER (39), JOLLES (40),
DHÉRÉ (30).

7° *Brome :*

CAPRANICA (41), BIERRY et RANC (42).

8° *Persulfate d'ammonium :*

HUGOUNENQ (43).

9° *Chlorate de potassium :*

KLEHBIEL (27).

10° *Perchlorure de fer + acide chlorhydrique ou acide acéti-
que :*

GUERRA (44), PIETTRE (45).

11° *Un mélange d'acides chlorhydrique et nitrique avec de l'al-
cool :*

HAMMARSTEN (46).

12° *Un mélange d'acide chlorhydrique et d'alcool avec de l'eau
oxygénée :*

ADLER et Else MEYER (47), MASLOW (48), H. STERN-
BERG (49).

13° *Acide trichloracétique :*

PIETTRE (50).

14° *Acide acétique + chlore :*

MALY (51).

β APRES ISOLEMENT DES PIGMENTS BILIAIRES

Cet isolement se fait de plusieurs façons : le plus souvent
il est suivi d'une oxydation du produit isolé, par un des procé-
dés cités précédemment ; nous mettons entre parenthèses à la

suite du nom des auteurs le réactif oxydant ou la technique adoptés :

a) *PRECIPITATION*

1° *Par les sels de baryum :*

SCHERER (52), HAMMARSTEN (46), (acides chlorhydrique et nitrique + alcool). W. ARNOLD (53), BIFFI (25) (acide chromique), BOUMA (54) (iode), GRIMBERT (14) (mélange (ClH, alcool, eau oxygénée)), LAEMMER et BECK (55) (azoréaction), JOLLES (40) (iode), Emmanuel-Gérard GOTTFRIED (56) (réactif de Fouchet), G. HUNTER (57) (azoréaction), A. FOUCHET (58) (perchlorure de fer et acide trichloracétique), A. W. J. H. HOITINK (59) (réactif de Fouchet), H. HUPPERT (60), (acide nitrique, perchlorure de fer et alcool), ADLER et Else MEYER (47) (alcool chlorhydrique et eau oxygénée), HARRISON (47 bis) (réactif de Fouchet).

2° *Par les sels basiques de plomb :*

SCHWERTFEGER (61).

3° *Par relargage au sulfate d'ammonium :*

C. MÉHU (62) (acide nitrique), WEISS (63) (acide chlorhydrique et alcool ou azoréaction).

4° *Par entraînement par un précipité d'urates :*

LEWIN (64), W. MARCADIE (65) (acide nitrique).

5° *Par le chlorure de zinc :*

STOKVIS (66).

6° *Par un lait de chaux :*

HUPPERT (60) (acide nitrique, perchlorure de fer et alcool), HOPPE-SEYLER (67), NAKAYAMA (68) (acide nitrique, perchlorure de fer et alcool), STEENSMAN (31) (acide nitreux), MASLOW (48) (alcool chlorhydrique et eau oxygénée), J. C. SCHIPPERS (69) (alcool, nitrite de sodium et acide chlorhydrique).

7° *Par CO_3Na_2 ou lessive de soude et Cl_2Ba ou Cl_2Ca :*

HILGER (70), SALKOWSKI (71) (nitrite de sodium et acide), H. FISCHER et JAKOB (72) (préparation de cristaux de bilirubine).

8° *Par les hydrates alcalinoterreux, sulfures humides de Pb, Bi, Cu ou précipités d'alcaloïdes :*

VITALI (73) (acide nitreux).

9° *Par le talc, le kaolin, l'aluminate de plomb, le plâtre :*

AUCHÉ (10) (spectroscopiquement), L. Van ITALLIE (74)
(par un oxydant quelconque).

10° *Par $\text{ClNa} + \text{NH}_3$:*

KNUTT R. E., HAWLEIN, WHIPPLE M. D. (75) (acide
nitrique, eau oxygénée).

b) EXTRACTION :

L'extraction est toujours faite avec du chloroforme et porte soit sur l'urine additionnée de chlorure de baryum, soit sur l'urine plus ou moins acidifiée.

SCHWANDA (76), GERHARDT (77), NEUMEISTER (78), BIERRY
et RANC (42), JOLLES (79).

c) Méthodes par azoréaction

Ces méthodes de recherche sont basées sur la propriété qu'a la bilirubine de donner avec l'acide diazobenzène sulfonique (réactif d'EHRlich) un produit de copulation ayant une coloration rouge violacé intense. On l'appelle en général diazoréaction ; le terme azoréaction nous paraît plus exact pour désigner la formation d'un azoïque. Cette méthode est infiniment plus sensible que la transformation en biliverdine. Cependant KERPOLA et LEIKOLA (80), analysant récemment le mécanisme intime de la réaction prétendent que la réaction de copulation est toujours accompagnée d'une oxydation de la bilirubine et que la coloration finale est due à la superposition des teintes de l'azo-dérivé et de la biliverdine.

Cette méthode a été préconisée ou étudiée par : EHRlich (81), RIEGLER (82), KROKIEWICZ et BATKO (83), PROSCHER (84), SCHILDBACH (85), RAPHAEL (86), PLECH (87), WEISS (88), ORNDORF et TEEPLE (89), HYMAN Van den BERGH (90), ZINS (91), HOESCH (92), G. HUNTER (93), K. JEGOROV (94), LAEMMER et BECK (55), GODFRIED (95), C. E. MAY, R. MARTINDALE, W. F. BOYD (96).

On peut la rapprocher de celle d'HERZFELD (97) laquelle consiste en une réaction colorée de la bilirubine au bain-marie avec un autre réactif d'EHRlich le diméthylaminobenzaldéhyde. Quoiqu'il s'agisse aussi de la formation d'une matière colorée, ce n'est plus une azoréaction.

d) Addition à l'urine d'une matière colorante suivie d'une estimation de la teinte résultante. —

On ajoute à l'urine un colorant tel que le bleu de méthylène et on estime la teinte verte qu'il donne avec la composante jaune due à la bilirubine. Cette méthode est fréquemment proposée comme mode de dosage des pigments biliaires. C'est pourquoi nous examinerons plus avant le mode opératoire au chapitre réservé à ce sujet. Il n'est pas besoin de souligner le manque de sûreté de tels procédés car l'urine a une teinte propre jaune fort variable que ces méthodes assimilent d'office à la bilirubine.

Les colorants utilisés sont variables : violet de méthyle, fuchsine, phénolphthaléine, alcaline et surtout bleu de méthylène.

A ce procédé se rattachent les noms de KONSTANTIN (98), BAUDOIN (99), MONKTON (100), NEERMANN (101), DUNCAN (102), PETERSEN (103), DECADE (104), ROCH (105), FRANKE (106), BALATRE (107), FELLINGER et MENKES (108).

Discussion de ces procédés - Recherches personnelles

Nous n'avons pas essayé toutes les techniques mentionnées ci-dessus ; deux méthodes seulement sont dignes de retenir l'attention : les méthodes par oxydation et par azoréaction ; la méthode spectroscopique d'un milieu aussi complexe que peut l'être une urine ictérique n'est pas sans risques, quant aux procédés qui emploient l'addition de colorants accessoires, ils sont trop grossiers. La méthode qui emploie l'azoréaction est de beaucoup la plus sensible. Malheureusement, au début et à la fin de l'ictère, c'est-à-dire aux moments précis où la détection du pigment serait intéressante, l'urine renferme une forte quantité d'urobilinogène qui donne, avec le diazoréactif, une teinte brun-jaune masquant toute azoréaction bilirubinique.

a) Caractérisation de la bilirubine par relargage et azoréaction.

Quand l'urobilinogène manque, le relargage qui conduit à l'isolement du pigment biliaire (MÉHU (62), WEISS (63)), permet d'augmenter considérablement la sensibilité et la certitude de la méthode. Nous avons adopté la technique suivante : on relargue une quantité quelconque d'urine non filtrée, par saturation à

froid au sulfate d'ammonium. Puis on filtre (en s'aidant du vide) sur papier. Le relargat bien essoré est ensuite extrait en plusieurs fois, par un petit volume (4 à 5 cc) d'alcool ammoniacal (à 0 cc. 8 p. 100). Il est préférable d'utiliser l'alcool ammoniacal car la potasse alcoolique qu'utilisent LAEMMER et BECK (55), détruit très rapidement la bilirubine (KUSTER (109)). Puis, sur la moitié de cette solution, on fait une azoréaction en ajoutant 0 cc. 25 de réactif d'EHRlich (*), la seconde moitié servant de témoin.

Cette méthode s'est montrée infiniment plus sensible que celles de GRIMBERT ou de GMELIN pour caractériser des traces de bile ajoutée à de l'urine normale : elle permet de dépasser largement les limites de sensibilité des méthodes précédentes, jusqu'à un taux qui dépend de la quantité d'urine mise en jeu.

b) *Caractérisation directe de la bilirubine par oxydation.*

Le trouble inévitable que produit l'urobilinogène nous a conduit à rechercher, dans les réactions d'oxydation une technique moins fine, mais plus caractéristique que la précédente. La formation d'un composé vert aux dépens d'un pigment jaune est en effet moins banale que la formation d'un azoïque rouge. On pourrait, il est vrai, contrôler la coloration obtenue par un spectroscope ; c'est une complication bien illusoire lorsqu'on se sert d'un petit spectroscope à main et bien grosse lorsqu'on s'adresse à une bonne technique spectroscopique.

Nous espérons établir un procédé simple, plus sensible que les anciennes méthodes par oxydation, l'intensité colorante de la biliverdine est en effet moindre que celle de la bilirubine dont elle provient et *à fortiori* que celle de l'azobilirubine. Nous devons dire qu'il ne nous a pas été possible d'y arriver par la méthode du relargage. Au cours des très faibles bilirubinuries en effet, l'urine est riche en pigments divers que l'on retrouve dans

(*) Ce réactif est préparé au moment du besoin en mélangeant 10 cc de (1) à 0 cc 3 de (2) :

- | | | | |
|-----|---|---------------------|----------------------|
| (1) | { | acide sulfanilique | 0 g 10 |
| | { | acide chlorhydrique | |
| | { | concentré | 1 cm ^e 5 |
| | { | eau distillée | 98 cm ^e 5 |
| (2) | { | nitrite de sodium . | 0 g 50 |
| | { | eau distillée | 100 g |

le relargat. Et la quantité de bilirubine étant trop faible comparativement à celle des autres pigments, la teinte de la biliverdine n'est pas perceptible dans le milieu très coloré que constitue une solution de relargat. C'est-à-dire qu'il ne faut pas songer à concentrer les pigments par ce procédé en croyant sensibiliser la méthode.

Nous avons été ramené finalement à une méthode, analogue aux anciennes, opérant directement sur l'urine, rapide, ayant surtout l'avantage de donner une coloration beaucoup moins fugace que celle de GMELIN.

Pour cela nous avons mis à profit les remarques de KUSTER (110), que la bilirubine donne instantanément de la biliverdine par l'acide acétique chloré, et de PIETTRE (50) que le verdissement est encore plus rapide par l'acide trichloracétique. La plupart des agents oxydants utilisés dans les méthodes que nous avons mentionnées ont en effet leurs inconvénients : ou bien ils sont trop puissants et passent le stade biliverdine (acide nitrique, acide nitreux, acide chromique, etc...) ou bien ils ont une coloration propre gênante (perchlorure de fer, iode, brome), ou bien ils sont trop peu énergiques (eau oxygénée).

Nous avons pris pour source de chlore, la chloramine (tochlorine ou paratoluènesulfochloramide) qui, en solution aqueuse à 1 p. 100 se conserve remarquablement. Au moment du besoin, on ajoute quelques gouttes de cette solution à un centimètre cube d'acide trichloracétique à 20 p. 100. On obtient un mélange parfaitement incolore, ayant en outre l'avantage d'oxyder immédiatement la bilirubine. On peut utiliser ce réactif exactement comme le réactif de GMELIN, c'est-à-dire qu'on lui superpose, sans la mélanger, l'urine dans laquelle on veut déceler les pigments biliaires.

L'anneau vert obtenu est pur de toute teinte rouge ou jaune venant d'une oxydation poussée du pigment. De plus, il est très stable et ces deux avantages nous le font préférer à l'acide nitrique nitreux.

Limite de sensibilité de ces réactions :

Quelques auteurs ont déterminé quelle était la plus petite dose de bilirubine que leur technique pouvait déceler dans un litre d'urine.

Nous avons relevé les chiffres suivants :

Jolles 1 mg.

E. G. GODFRIED (56) cite quelques chiffres limite (méthode à l'anneau)

Oxydation à l'iode 0 mg. 7 à 3 mg.

Réaction de Gmelin 0 mg. 4 à 0 mg. 8

(alors que Gilbert HERSCHER et POSTERNAK estiment cette limite à 25 mg.)

Réaction de Huppert-Salkowski . 0 mg. 2 à 0 mg. 4

Réaction de Hunter 0 mg. 1

Réaction de Zeehuisen 0 mg. 1 à 0 mg. 2

Réaction de Harrison 0 mg. 03 à 0 mg. 08

La limite de sensibilité des réactions que nous avons indiquées est pratiquement infinie pour la première (relargage et azo-réaction), la seconde (oxydation directe par l'acide trichloracétique et la tochlorine) nous a paru plus sensible que la réaction de Gmelin et du même ordre de sensibilité que celle de Grimbert.

2° METHODES QUANTITATIVES

Nous tenons à répéter que la seule caractérisation des pigments biliaires est assez vaine en plein ictère, et bien délicate au début ou à la fin de la maladie. Leur dosage facile, par contre, est susceptible d'apporter à la clinique d'utiles renseignements.

PINCUSSEN dans le traité classique d'Oppenheimer, édition de 1925 (111) avoue que nous sommes fort peu renseignés quant à la teneur en bilirubine des urines ictériques.

HUPPERT a trouvé, et le fait est confirmé par SCHWANDA, qu'une urine ictérique contenait de 2 à 15 milligrammes pour cent de bilirubine.

Les procédés de dosage de la littérature s'appuient sur les mêmes principes que les procédés de recherche. Toutefois SCHILLING (121) entraîne la bilirubine sur un précipité de chaux et fait une comparaison colorimétrique avec une solution de bichromate de potassium (?) cf. L. PINCUSSEN (111).

a) Méthodes spectroscopiques

VIERORDT (112) les utilisa le premier, KUNKEL (113), VOSIUS (114), FRANKE (115), JENDRASSIK (116) suivirent la même voie. FRANKE par exemple, oxyde la bilirubine. Il voit décroître l'absorption dans le rouge et mesure ce décroissement au spectrocolorimètre. Il opère comparativement avec une solution de bilirubine et, des mesures faites avant et après l'oxydation, déduit la teneur en pigment.

b) Méthodes par oxydation

GILBERT, HERSCHER et POSTERNAK (29) utilisent la technique classique de l'anneau limite. Ils effectuent la réaction de Gmelin sur des dilutions croissantes d'urine jusqu'à disparition de l'anneau vert (ils ajoutent à leur urine un peu de blanc d'œuf, le léger anneau albumineux qui se forme au contact de l'acide facilitant la lecture).

E. A. PETERMAN et T. B. COOLEY (117) font un dosage colorimétrique par comparaison après oxydation nitrique.

HOOPER (118) avait déjà utilisé ce procédé, et, comme le produit de la réaction n'était pas simple, il utilisait une gamme correspondant aux deux principaux pigments obtenus et faite d'un mélange de bleu de Nil et de diméthylamidoazobenzol.

Mais le plus souvent, on commence par absorber la bilirubine sur un précipité au moyen de Cl_2Ba ou de chaux comme nous l'avons vu plus haut. Ainsi JOLLES (119) extrait au chloroforme ce précipité barytique puis oxyde le pigment par l'iode en excès et titre ensuite l'iode restant.

BOUMA (120) oxyde par une solution chlorhydrique de perchlorure de fer puis compare à une gamme empirique.

KNUTT (122), après un relargage partiel du pigment au moyen de chlorure de sodium, oxyde par le réactif de Gmelin et compare la teinte obtenue, à une gamme étalon contenant du sulfate de cuivre et du bichromate de potassium.

c) Méthodes par azoréaction

L'azoréaction est effectuée sur un soluté extractif. Les uns agitent l'urine acidifiée avec du chloroforme qui s'empare du pigment, et pratiquent ensuite l'azoréaction sur le produit extrait (KERPPOLA et LEIKOLA (80), HUNTER (123)). Les autres, plus nombreux, précipitent la bilirubine au moyen d'un sel de baryum et puisent ensuite la précipité à l'aide d'un solvant approprié (potasse alcoolique), après quoi la solution de bilirubinate est additionnée de réactif d'Ehrlich (LAEMMER et BECK (55)).

Le dosage proprement dit se fait sur la solution colorée obtenue, soit directement au photomètre, soit par comparaison avec une gamme étalon.

Plusieurs formules de solution permettant d'établir cette gamme de comparaison ont été proposées.

Les uns utilisent les sels de Cobalt H. Van den BERG (90), NICHOLS et JACKSON (125), GODFRIED (56).

D'autres le *permanganate de potassium*, RHAMY et ADAM (126).

Hans FISCHER et BARRENSCHEEN (127) préfèrent une solution éthérée de *sulfocyanure ferrique*. A ce sujet d'ailleurs ils critiquent fort la méthode de Van den BERGH et ajoutent encore que la totalité de la bilirubine ne peut être extraite de l'urine au moyen du chloroforme.

d) Méthodes par addition de colorant

K. FRANKE (106) additionne l'urine d'une solution de bleu de méthylène, jusqu'à ce que la teinte jaune, puis verte, ait fait place à une teinte bleue. Il estime que, si l'on opère avec 5 cc. d'urine, ou 5 cc. d'une solution à 1 mg. % de bilirubine, deux gouttes d'un soluté à 0,20 p. 100 de bleu de méthylène mesurées au compte-gouttes normal (soit 0 cm³ 15), représentent 0 mg. 10 de bilirubine.

FELLINGER et MENKES (108), modifiant cette technique, comparent à une gamme contenant du bichromate de potassium et du bleu de méthylène, l'urine à laquelle on a ajouté de bleu de méthylène.

GRECO (124) extrait au moyen du chloroforme un précipité obtenu en ajoutant du chlorure de baryum à l'urine. La solution chloroformique est ensuite additionnée d'isoparanitrobenzène sulfonate de sodium et on compare sa coloration à celle, d'une gamme étalon.

Essais personnels de dosage de la bilirubine par relargage et azoréaction

Notre étude sur le relargage nous donnait un procédé de choix pour la séparation sans altération du pigment biliaire de l'urine. MÉHU (62) puis WEISS (129), avaient remarqué déjà que la bilirubine est totalement relarguée, lorsqu'on sature le milieu de sulfate d'ammonium.

Nous avons donc essayé d'extraire le pigment relargué avec l'intention de poursuivre ensuite le dosage selon la technique de LAEMMER et BECK.

Mais il était impossible, même après un grand nombre de

lavages à l'alcool ammoniacal, d'extraire la totalité du pigment fixé par le relargat. H. FISCHER (128) avait déjà noté le même phénomène sur l'urine elle-même, l'expliquant par des combinaisons diverses de la bilirubine avec des graisses par exemple. En vérité, elle semble adsorbée énergiquement par les diverses substances qui constituent le relargat, sans que l'alcool ammoniacal puisse suffire à l'en détacher.

Nous avons cherché en vain un autre solvant qui puisse produire une élution totale et rapide.

D'ailleurs la facile oxydabilité de la bilirubine d'une part, les incertitudes auxquelles conduit l'azoréaction d'autre part (*) nous incitèrent rapidement à chercher une autre voie.

Bien qu'elle n'ait plus aucun point commun avec le relargage, nous nous permettons de la faire entrer dans ce travail puisqu'elle représente l'aboutissement de nos recherches sur le dosage de la bilirubine par relargage.

Méthode personnelle de dosage des pigments biliaires de l'urine

La méthode à laquelle nous nous sommes arrêtés diffère essentiellement de toutes les précédentes. C'est, si l'on veut, une méthode indirecte à la façon de SCHILLING (121), mais, pour nous mettre à l'abri des causes d'erreur qu'apportent les pigments non biliaires de l'urine, nous transformons et faisons disparaître la bilirubine et déterminons la différence de coloration de l'urine avant et après l'élimination. Il suffit de comparer avec des repères colorimétriques préparés avec des solutions stables et dont l'équivalence avec une bilirubine étalon a été établie une fois pour toutes.

Nous étudierons successivement :

- 1° Elimination du pigment biliaire de l'urine ;
- 2° Bilirubine de référence ;
- 3° Echelle colorimétrique ;
- 4° Technique du dosage ;
- 5° Manière d'exprimer les résultats. Quelques résultats cliniques ;
- 6° Causes d'erreur, leurs remèdes ;

(*) Non seulement on a pu mettre en évidence au moins deux azoïques lors de cette réaction, mais encore Kerppola et Leikola (80) ont montré récemment qu'une partie de la bilirubine n'entre pas en réaction et s'oxyde en donnant de la biliverdine.

1° Elimination du pigment biliaire de l'urine

Pour éliminer le pigment, il faut rejeter le noir animal qui enlève à peu près tous les pigments urinaires.

Nous avons naturellement pensé au relargage. Mais il élimine lui aussi, à peu près tous les pigments autres que l'urochrome (WEISS (129)) ; le relargage conviendrait lorsqu'on se trouve en présence de quantités énormes de bilirubine, vis-à-vis desquelles les pigments accessoires comptent très peu dans la coloration. Mais pour avoir une méthode applicable à toutes les phases de l'ictère, nous avons préféré y renoncer.

A la suite de recherches dans des domaines différents sur le pouvoir absorbant du bioxyde de manganèse, M. CHARONNAT nous a conseillé d'employer cette substance pour la décoloration de l'urine. Lorsqu'on agite une urine normale avec du bioxyde de manganèse et qu'on centrifuge, la coloration, au premier examen, ne change guère. Mais un peu de bioxyde reste en suspension. On peut le faire disparaître par une faible quantité de bisulfite de sodium, et l'on constate que la coloration naturelle est à peine atténuée, et qu'elle est identique à celle qui reste après relargage. L'urochrome n'est donc pas touché dans le traitement ci-dessus.

Il va de soi que l'emploi de bisulfite et d'un acide (pour faciliter la réaction), peut modifier la couleur du pigment naturel de l'urine, laquelle est très sensible comme beaucoup d'indicateurs à des variations de pH. C'est pourquoi dans toutes nos expériences, nous nous sommes mis à l'abri de ces variations de coloration des pigments sous l'influence des variations de concentration des ions H^+ .

Le pigment biliaire est détruit par le bioxyde de manganèse. Il est impossible de le mettre en évidence dans le filtrat par aucune des méthodes citées plus haut ; d'autre part, en redissolvant le bioxyde de manganèse resté sur le filtre au moyen d'un peu de bisulfite, on ne retrouve pas de bilirubine même lorsqu'on est parti d'une urine très riche en pigment et qu'on opère sur un volume notable. Le bioxyde de manganèse agit comme oxydant. En opérant avec une urine très ictérique et une petite quantité de bioxyde en suspension, nous avons pu mettre en évidence la coloration verte de la phase biliverdine.

Le temps nécessaire pour l'oxydation et la disparition de la bilirubine est très réduit ; à la suite d'essais variés, nous avons

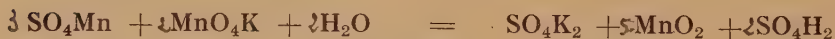
adopté la durée de cinq minutes pour la concentration de bioxyde de manganèse que nous indiquerons plus loin.

Le traitement préalable de l'urine au bisulfite est indiqué pour ramener à l'état de pigment jaune, la bilirubine qui est déjà plus ou moins beliverdinisée. Le bisulfite agit comme réducteur et peut-être aussi comme sulfonant car il donne, même avec la biliverdine, un dérivé jaune paille qui n'est plus relargable, ne donne plus la réaction de Gmelin ni l'azoréaction ; le bioxyde de manganèse le décolore mieux encore que la bilirubine. La sulfonation paraît se faire sur les H— mobiles de la bilirubine, puisque l'azoréaction devient impossible. Ce dérivé est instable ; l'urine bisulfitée se décolore à la longue par transformation plus profonde ; l'altération laisse tout le temps pour le dosage colorimétrique.

Lorsque l'urine est très fortement chargée en pigments biliaires, il y a en outre, insolubilisation partielle de la bilirubine. Dans ce cas, il faudra diluer l'urine avant de faire agir le bisulfite.

Préparation de la suspension de bioxyde de manganèse

Nous utilisons le procédé simple qui consiste à précipiter des solutions équimoléculaires de sulfate manganoux et de permanganate de potassium.



et lavons le précipité par essorage à la trompe, jusqu'à ce que l'eau de lavage ne précipite plus que faiblement une solution de chlorure de baryum.

Le bioxyde essoré est, avant toute dessiccation, mis en suspension aqueuse à 4 p. 100 et conservé pour l'emploi.

2° Choix d'une bilirubine de référence

Lorsqu'on examine tous les mémoires consacrés à la préparation de la bilirubine pure, on s'aperçoit qu'il n'est à peu près aucun caractère de pureté indiscutable de cette substance. Elle est trop complexe pour que son analyse élémentaire décèle de petites quantités de pigments voisins, son point de fusion n'est pas fixé avec certitude ; son pouvoir rotatoire n'a jamais été

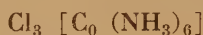
mesuré et ne doit pas être facile à atteindre avec une coloration aussi intense dans l'orangé. Cette absence de critères est d'autant plus grave que la bilirubine est un corps difficile à extraire, difficile à purifier. Nous avons nous même essayé d'en préparer à partir d'urines ictériques, qui constitueraient à notre avis une bien meilleure source que les calculs biliaires de bœuf jusqu'ici employés, mais nous n'avons pas encore réussi à obtenir cette bilirubine à un état de pureté satisfaisant. L'incertitude, sur la pureté de la bilirubine, est telle que les auteurs ne sont pas d'accord sur sa solubilité. Ainsi H. FISCHER (137) reconnaît qu'elle est variable pour un même solvant. Dans ces conditions la seule propriété à laquelle on puisse se référer pour apprécier une bilirubine est son pouvoir colorant. Nous avons choisi deux bilirubines commerciales « garanties pures », et, comme on le verra plus loin, nous avons constaté, par comparaison avec des colorants minéraux stables, que l'intensité de leur coloration diffère d'un peu plus de 10 p. 100.

Il nous paraît plus prudent d'utiliser comme étalon colorimétrique non pas une solution de bilirubine pure, mais une solution auxiliaire stable, de composition bien précise, dont nous allons parler dans un instant, et d'exprimer les résultats en « unité bichromate ». Nous donnons d'ailleurs l'équivalence de l'unité bichromate avec l'étalon de bilirubine que nous avons prise pour standard. Pour des recherches ultérieures et pour d'autres auteurs, l'étalon de bilirubine sera plus ou moins différent, le nôtre sera plus ou moins altéré, l'unité bichromate restera toujours bien définie.

3° Echelle colorimétrique adoptée

On a proposé bien des fois, et notamment pour le sérum, de substituer le bichromate de potassium à la bilirubine pour exprimer l'intensité de coloration. Mais la nuance n'est pas exactement la même pour les deux solutions. La bilirubine est plus orangée. Il convient donc d'ajouter un correctif. FIESSINGER et WALTER (139) ont utilisé l'hélianthine. Mais nous préférons un colorant chimiquement mieux défini. Nous avons utilisé d'abord l'alizarine sulfonate, mais les gammes que nous avons préparées ne se sont pas montrées assez stables. Finalement, nous avons adopté un complexe minéral qui apporte la nuance désirée, qui est d'une très grande stabilité, qu'on peut obtenir avec le degré

de pureté que l'on veut et dont la composition est rigoureusement définie. Ce complexe est le chlorure de cobaltihexammine



dont la préparation est classique.

Préparation de la gamme

Solutions nécessaires :

a) bichromate de potassium pur et sec 0 g. 20,
eau distillée q. s p. 100 cm³.

b) Cobaltihexammine pure 2 g.
eau distillée q. s p. 100 cm³.

avec ces solutions on fait les dilutions suivantes :

Numéro du tube N	cm ³ de solution de bichromate	cm ³ de solution de cobaltihexa- mmine	cm ³ d'eau distillée	Nombre d'unités bichromate N/2
1	0.25	0.2	19.75	0.5
2	0.50	0.2	19.50	1
3	0.75	0.2	19.25	1.5
4	1	0.2	19	2
5	1.25	0.2	18.75	2.5
6	1.50	0.2	18.50	3
7	1.75	0.2	18.25	3.5
8	2	0.2	18	4
9	2.25	0.2	17.75	4.5
10	2.50	0.2	17.50	5
11	2.75	0.2	17.25	5.5
12	3	0.2	17	6
13	3.25	0.2	16.75	6.5
14	3.50	0.2	16.50	7
15	3.75	0.2	16.25	7.5
16	4	0.2	16	8
17	4.25	0.2	15.75	8.5
18	4.50	0.2	15.50	9
19	4.75	0.2	15.25	9.5
20	5	0.2	15	10
21	5.25	0.2	14.75	10.5
22	5.50	0.2	14.50	11
23	5.75	0.2	14.25	11.5
24	6	0.2	14	12

ces dilutions sont introduites dans des tubes identiques à ceux

que l'on utilisera pour le dosage et ces tubes sont ensuite scellés à la lampe.

4° Technique adoptée pour le dosage

L'urine doit être examinée dès que possible. En effet, Sivo et FORRAI (130) ont montré que la bilirubine est éminemment oxydable ; d'autre part, au cours de la conservation de l'urine, il pourrait se produire des précipitations très gênantes pour un examen colorimétrique, d'autant plus qu'il faut éviter toute filtration. En effet, le papier filtre, comme les précipités, adsorbent énergiquement les pigments biliaires, une urine ictérique filtrée est infiniment moins colorée.

Dans deux tubes à essais A et B, on met 10 centimètres cubes d'urine limpide (*), 0,2 centimètre cube de solution commerciale de bisulfite de sodium. Après agitation, on abandonne à froid pendant 20 minutes. On ajoute alors au tube A, 10 centimètres cubes d'eau distillée et au tube B, 10 centimètres cubes de suspension de bioxyde de manganèse et on agite. Au bout de cinq minutes au plus, on filtre le contenu de ce dernier (au besoin, on décolore le filtrat au moyen d'une goutte de bisulfite s'il contient un excès de bioxyde colloïdal). On introduit ensuite ces tubes dans un comparateur de Walpole, dans l'ordre représenté par le schéma suivant (fig. 2) en C est un tube contenant

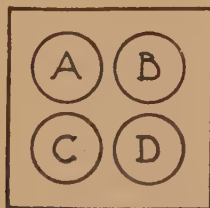


Fig. 2

de l'eau distillée et en D un des tubes de la gamme colorée.

Bien entendu, tous les tubes devront être de même verre, de même diamètre et même d'assez fort diamètre (nous avons utilisé des tubes de 2 centimètres).

(*) Diluée au besoin par addition d'eau distillée si la concentration pigmentaire est telle que les colorations obtenues ne soient pas dans les limites de la gamme.

5° Expression des résultats

Nous appelons *unité bichromate*, la coloration due à un milligramme de bichromate de potassium dissous dans les 20 centimètres cubes d'eau de nos tubes et corrigée par addition de cobaltihexammine, comme il est dit ci-dessus.

L'unité bichromate équivaut *sensiblement* à la coloration qu'on obtient en traitant de même façon que l'urine 10 centimètres cubes d'une solution (*) de 1 mg. de bilirubine dans un litre d'eau distillée ou dans un litre d'urine normale.

Par conséquent, lorsqu'en partant de 10 centimètres cubes d'une urine pathologique, on obtient une coloration équivalente à celle du tube N de la gamme, on peut dire qu'elle correspond à N/2 mg. de bilirubine par litre.

Si l'on est parti de n centimètres cubes d'urine que l'on a dilués à 10 cm³, le nombre d'unités bichromate qui exprime la teneur en bilirubine par litre devient :

$$\frac{N}{2} \times \frac{10}{n} \text{ soit } \frac{5N}{n}$$

L'urine normale nous donne, par ce dosage, une teneur pigmentaire comprise entre 0 et 1 parfois 2 unités bichromate. Le plus souvent d'ailleurs, cette valeur est inférieure à 0,5 unité.

Quelle est la signification de cette valeur pigmentaire ; nous pouvons seulement dire qu'il ne s'agit pas de bilirubine vraie, car, même dans l'urine à deux unités, nous n'avons pu la déceler, même après une forte concentration sur un précipité. Il s'agit très probablement d'un pigment dérivé de la bilirubine et qui représente la forme d'élimination des traces de bilirubine présentes dans le sérum normal : nous avons entrepris des recherches sur ce sujet, recherches dont nous ne pouvons faire état ici.

(*) Pour obtenir ces dilutions, nous avons préparé une solution ammoniacale de bilirubine à 0 g 010 p. 100 que nous avons ensuite ajoutée en proportions voulues à l'eau ou à l'urine.

Avec la bilirubine Fraenkel et Landau de Berlin, l'équivalence est de 0 mg 9 ; avec la bilirubine Homburg (préparée pour les essais chimiques selon v. Bergmann), l'équivalence est de 0 mg 8 par litre pour une unité bichromate.

Dans les ictères bénins, le chiffre monte immédiatement à 10, 20 unités bichromate, et dans l'ictère grave, 150 à 200 unités sont chose courante. Dans une ictère grave, la quantité de bilirubine présente dans un litre d'urine fraîche atteint donc plusieurs décigrammes.

Nous avons pu suivre quelques cas d'ictère :

Madame P. — Douleurs dans l'hypocondre droit. On prévoit un ictère :

9 juillet : 11 unités. Réaction de Grimbert négative ;

10 juillet : 24 unités. Malade présentant du subictère.

Réaction de Grimbert faiblement positive (après addition d'eau oxygénée seulement) ;

11 juillet : 7 unités ;

12 juillet : moins de 1 unité.

Monsieur P. — Spirochétose ictérohémorragique.

3 décembre : 40 unités.

4 décembre : 90 unités ;

12 décembre : 90 unités.

Mort le 14 décembre.

Madame B. — Ictère grave (d'origine néoplasique).

26 février : 27 unités ;

27 février : 45 unités ;

28 février : 81 unités.

Morte le 29 février.

Malame L. — Ictère.

3 juillet : 55 unités ;

5 juillet : 20 unités ;

6 juillet : 9 unités. Réaction de Grimbert faiblement positive (après addition d'eau oxygénée).

7 juillet : 2 unités.

On voit, d'après ces quelques résultats, que la technique que nous proposons est plus sensible que la réaction de Grimbert ; elle n'est pas moins expéditive et offre l'avantage de conduire à des résultats quantitatifs.

6° Les causes d'erreur - Leurs remèdes

Il est indispensable d'acidifier très légèrement (au tournesol) les urines alcalines, sinon la décoloration ne se produirait pas.

On doit faire agir le bisulfite à froid car à chaud, le pig-

ment de l'urine brunit ; le traitement à froid a d'ailleurs l'avantage d'écarter le trouble qu'apporterait la présence d'albumine.

Il faut effectuer la lecture assez rapidement après la décoloration car la teinte du dérivé sulfoné (tube A) s'atténue après un quart d'heure, surtout si l'on a dû procéder à des dilutions.

Ces dilutions se feront de préférence après le traitement au bisulfite et au bioxyde de manganèse et non avant, sauf si l'urine donnait lieu à une précipitation lors de l'addition du bisulfite. Bien entendu, les tubes A et B doivent être dilués de la même manière.

Nous avons étudié les perturbations possibles qu'entraîne l'élimination de certains médicaments.

Si l'urine contient des dérivés rhéïques, il est nécessaire d'ajouter 0 cm³ 5 d'acide acétique dans chaque tube pour atténuer la teinte due aux produits d'élimination de la rhubarbe.

Le pyramidon, la cryogénine, qui pourtant colorent fortement l'urine, n'apportent aucune perturbation car les pigments qu'ils ajoutent sont décolorés par le bisulfite.

Le bleu de méthylène, s'il est peu abondant, ne sera pas très gênant, car le bisulfite le décolore. Mais peu à peu il y a recoloration à l'air, recoloration qu'on pourra éviter en mettant une légère couche d'huile de paraffine à la surface du liquide. Si la concentration du bleu est forte, le dosage est impossible car les actions successives du bisulfite et du bioxyde de manganèse donnent au filtrat une teinte violette dont on ne peut se débarrasser.

II. UROBILINURIE

L'urine est encore susceptible de contenir un autre pigment biliaire, ou plutôt un dérivé de la bilirubine. C'est l'urobiline, ensemble de pigments (131) que F. MULLER (133) appelle hémibilirubine et dont le chromogène, urobilinogène, a été identifié par H. FISCHER (137), comme un produit de réduction de la bilirubine : le mésobilirubinogène.

L'urobiline et plus probablement l'urobilinogène, sont des constituants normaux de l'urine (134) (135). Mais si l'insuffisance hépatique s'accompagne souvent d'urobilinurie (ou plutôt d'hyperurobilinurie), c'est surtout au début et à la fin de l'ictère qu'elle est nette.

Le relargage de ces deux substances est une chose bien

établie. Il est même à la base d'un procédé de dosage de CHARNAS (136) et du procédé de préparation de GARROD et HOPKINS que cite H. FISCHER (132). C'est pourquoi nous ne l'avons pas étudié.

En résumé

Parmi les substances que l'on rencontre accidentellement dans l'urine, nous avons montré que certaines comme les glucides, l'acide β oxybutyrique, ne relarguent pas, les peptones non plus contrairement à ce qui se passe dans le cas des albumoses ou des albumines urinaires.

Les pigments biliaires ont retenu plus longuement notre attention. Nous avons vu que bilirubine, urobiline et urobilino-gène sont relargables. Mais il nous a été impossible d'appliquer cette propriété à la recherche ou au dosage de la bilirubine dans les urines normales ou pathologiques.

Toutefois, par une voie détournée, nous avons établi une méthode empirique d'estimation quantitative des pigments biliaires ; estimation particulièrement sensible puisqu'elle permet de déceler quelques milligrammes de bilirubine par litre d'urine et dont l'emploi en clinique permettra, croyons-nous, de compléter l'étude des ictères.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OHLSSON, *Biochem. Z.*, 1916, 77, 232.
- (1 bis) J. GUIART et L. GRIMBERT, *Diagnostic chimique, microscopique et parasitologique*, Lamarre éditeur, Paris 1922, p. 855.
- (2) VOSSIUS, *Arch. exp. Pathol. Pharm.*, 1879, 2, 427.
- (2 bis) OBERMAYER, in *Oppenheimer Hand. d. Bioch.*, 2^e éd., tome 4, p. 560.
- (3) AUCHÉ, *C. R. Soc. Biol.*, 1908, 64, 297.
- (4) U. BIFFI et P. GALLI, *Physiol. pathol. gen.*, 1907, 9, 721.
- (5) E.-A. MOLINELLI et M. ROYER, *C. R. Soc. Biol.*, 1929, 102, 873.
- (6) FUDAKOWSKY, *Zentralbl. f. med. Wissen.*, 1869, p. 129.
- (7) QUICKLAY, *Cincinnati Lancet and Clin.*, juillet 1880.
- (8) R. v. ZEYNEK, *Wiener Klin. Woch.*, 1899, p. 568.
- (9) PARMENTIER, Thèse Paris 1905.
- (10) AUCHÉ, *C. R. Soc. Biol.*, 1908, 64, 299.
- (11) SHEARD, MANN, BOLLMANN, *Amer. Physiol.*, 1927, 81, 774.
- (12) SHEARD, BALDES, MANN, BOLLMANN, *Amer. Physiol.*, 1926, 76,

- (13) H. FISCHER, in *Oppenheimer, Hand. d. Bioch.*, 1933, p. 254.
(14) L. GRIMBERT, *J. Pharm. Chim.*, 1905, 4, 22, 487.
(15) TIEDMAN et GMELIN, *Die Verdauung nach Versuchen*, 1826, 1, 80.
(16) ROSENBACH, *Zentr. f. d. Med. Wissen.*, 1876, 5.
(17) DRAGENDORFF, *Z. anal. Chem.*, t. 25, p. 459, cit. par Obermayer (39).
(18) PRESSLICH, *Münch. med. Woch.*, 1905, 52, 220.
(19) BRUCKE, *J. prak. Chem.*, 1877, p. 22 ; *Chem. Zentr.*, 1859, 248, cité par Obermayer (39).
(20) FLEISCHL, *Z. anal. Chem.*, t. 5, p. 502, cité par Obermayer (39).
(21) VON SPALITTA, *Zentr. f. Physiol.*, 1904, 4, 91.
(22) VITALI, *Ann. Chim. Appl. alla Medicina*, 1873, 57, 278.
(23) HALBERKANN et REICHE, *Die mediz. Welt.*, 1933, 2, 265.
(24) ROSENBACH, *Dtsch. med. Woch.*, 1892, N° 17 ; *Z. anal. Chem.*, 1893, 32, 515.
(25) BIFFI, *Gazetta degli Ospedali*, 1901, n° 18.
(26) MASSET, *Répertoire de pharmacie*, 1879, 7 2^e série, 58.
(27) KLEHBIEL, *Wiener med. Woch.*, 1883, n° 10.
(28) ULTZMANN, *Wiener med. Presse*, 1877, n° 32.
(29) GILBERT, HERSCHER et POSTERNAK, *C. R. Soc. Biol.*, 1903, 55, 530 - 1587.
(30) DHERÉ, *C. R. Soc. Biol.*, 1930, 103, 371.
(31) STEENSMA, *Biochem. Z.*, 1906, 8, 209.
(32) J. GLASS, *Mediz. Welt.*, 1929, 3, 824.
(33) TROUSSEAU et DUMONTPALLIER, *L'union médicale* 1863, N° 39.
(34) MARÉCHAL, *Z. anal. Chem.*, 1869, 8, 99.
(35) W.-G. SMITH, *Dublin Journ. of. med. Sciences*, 1876, p. 449.
(36) KATHREIN, *Chem. Zentr.*, 1891, p. 272, cité par Obermayer (39).
(37) H. ROSIN, *Z. anal. Chem.*, 1893, 32, 515.
(38) LE NOBEL, *Zentr. f. klin. Med.*, 1890, n° 11.
(39) OBERMAYER et POPPER, *Wiener klin. Woch.*, 1908, 25, 895.
(40) JOLLES, *Z. physiol. Chem.*, 1899, 27, 83 ; *Z. anal. Chem.* 1903, 42, 713.
(41) CAPRANICA, *Moleschotts Unters. z. Naturlehre*, n° 13, p. 190.
(42) BIERRY et RANC, *C. R. Soc. Biol.*, 1907, 63, 608.
(43) HUGOUNENQ, *C. R.* 1901, 132, 91.
(44) GUERRA, *Ac. med. di Torino*, 1900.
(45) PIETTRE, *C. R.* 1909, 148, 1213.
(46) HAMMARSTEN, *Skand. Arch. Physiol*, 9, p. 313, cité par *Bull. Soc. Chim. France*, 1900, 24, 222.
(47) ADLER et ELSE MEYER, *Klin. Woch.*, 1923, 258.
(47 bis) HARRISON, *Biochem. J.*, 1934, 28, 2056.
(48) MASLOW, *Z. physiol. Chem.*, 1911, 74, 297.

- (49) H. STERNBERG, *Biochem. Z.*, 1926, 171, 217.
- (50) PIETTRE, *C. R.* 1908, 147, 1492.
- (51) MALY, *Ann.* 1875, 175, 85.
- (52) SCHERER, *Ann.*, 1845, 53, 277.
- (53) W. ARNOLD, *Przegląd lekarski*, t. 37, n° 36.
- (54) BOUMA, *Dtsch. Med. Woch.*, 1902, N° 48.
- (55) LAEMMER et BECK, *C. R. Soc. Biol.*, 1933, 113, 166.
- (56) E.-G. GOTTFRIED, *Chem. Zentrbl.*, 1935, 17, 2705.
- (57) G. HUNTER, *Amer. Med. Assoc. Journ.*, 1930, 23, 823.
- (58) A. FOUCHET, *J. Pharm. Chim.*, 1918, 18, 19.
- (59) A.-W.-J.-H. HOITINK, *Nederl. Tijdschr. Geneeskunde*, 1935, 79, 2928 ; *Chem. Zentr.*, 1935, 2, 1224.
- (60) H. HUPPERT, *Arch. f. Heilkunde*, 1867, 8, 361-467.
- (61) SCHWERTFEGER, *Arch. d. Pharm.*, 1848.
- (62) C. MEHU, *J. Pharm. Chim.*, 1878, 28, 164.
- (62 bis) C. MEHU, *L'urine*, Paris 1880.
- (63) WEISS, *Wiener Klin. Woch.*, 1916, n° 15 ; *Erg. d. Inn. med.*, 1922, 22, 139.
- (64) LEWIN, *Zentr. f. med. Wissen.*, 1875, 6.
- (65) W. MARCADIE, *Pharm. Journ.*, 1908, 26, 686.
- (66) STOKVIS, *Nederl. Tijdschr. voor Geneesk. Festb.*, 1882, 118.
- (67) HOPPE SEYLER, *Hand. phys. u. path. Chem. Anal.*, 1893, p. 229.
- (68) NAKAYAMA, *Z. physiol. Chem.*, 1902, 36, 398.
- (69) SCHIPPERS, *Biochem. Z.*, 1908, 9, 241.
- (70) HILGER, *Arch. d. Pharm.*, t. 6, p. 385, cité par Obermayer (39).
- (71) SALKOWSKI, *Arbeiten an d. path. Institut Berlin*, 1906, 504.
- (72) H. FISCHER et JAKOB, *Z. physiol. Chem.*, 1911, 73, 216.
- (73) VITALI, *Z. anal. Chem.*, 1867, 6, 501.
- (74) L. VAN ITALLIE, *Pharm. Weekblad*, 1929, 66, 13.
- (75) KNUTT. HAWLEIN, WHIPPLE, *J. exp. Med.*, 1935, 61, 127.
- (76) SCHWANDA, *Wiener med. Woch.*, 1865, n° 38 et 39.
- (77) GERHARDT, *Sitzungsber. d. phys. med. Ges. z. Würzburg*, 1881, T. 25.
- (78) NEUMEISTER, *Lehrb.*, 1895, 2, 377.
- (79) JOLLES, *Wiener med. Woch.*, 1899, 1097.
- (80) W. KERPPOLA et E. LEIKOLA, *Skand. Arch. Physiol.*, 55, 70, 77 ; *Chem. Zentr.*, 1929, 1, 1571.
- (81) EHRLICH, *Zentralbl. f. klin. Med.*, 1883, N° 45
- (82) RIEGLER, *Wien. klin. Blätter*, 1899, n° 12.
- (83) KROKIEWICZ et BATKO, *Münch. med. Woch.*, 1906, 52, 406.
- (84) PRÖSCHER, *Zentr. f. inn. Med.*, t. 22, p. 169.
- (85) SCHILDBACH, *Zentr. f. inn. Med.*, t. 26, p. 1097.
- (86) RAPHAËL, *St-Petersburger, med. Woch.*, n° 30, p. 128.
- (87) PLESCH, *Zentr. f. inn. Med.*, t. 27, p. 417, c. p. Obermayer (39).

- (88) WEISS, *Wiener klin. Wochschr.*, 1916, n° 15 ; *Erg. d. inn. Med.* 1922, 21, 139.
- (89) ORNDORF et TEEPLE, *Salkowski Vorschrift, Berlin Hirschfeld* 1904.
- (90) HYMANS v. d. Bergh, *Der Gallenfarbstoff in Blut, Monographie Leipzig* 1918.
- (91) ZINS, *Klin. Woch.*, 1923, 978.
- (92) HOESCH, *D. Arch. klin. Med.*, 1923, 142, 330.
- (93) G. HUNTER, *Can. Med. Assoc. Journ.*, 1930, 23, 823.
- (94) K. JEGOROV, *Chem. Zentr.* 1931, 1, 3030.
- (95) GODFRIED, *Biochem. J.*, 1934, 28, 2056.
- (96) C.-E. MAY, R. MARTINDALE, W.-F. BOYD, *J. Biol. Chem.*, 1934, 104, 255.
- (97) HERZFELD, *Z. physiol. Chem.*, 1912, 77, 280.
- (98) KONSTANTIN, *Union Pharm.*, 1876, cité par Obermayer (39).
- (99) BAUDOIN, *Sem. Med.*, n° 22, p. 398.
- (100) MONKTON, *Brit. Med. J.*, octobre 1902.
- (101) NEERMANN, *Hopitals tidende*, 1900, n° 21.
- (102) DUNCAN, *Brit. Med. J.*, février 1903.
- (103) PETERSEN (Otto v. C.-E.), *Chem. Zentr.*, 1911, 2, 1490.
- (104) J. DECADE, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1930, 12, 130.
- (105) ROCH, *Chem. Zentr.*, 1931, 1, 3030.
- (106) FRANKE, *Chem. Zentr.*, 1932, 1, 2873.
- (107) P. BALATRE, *J. Pharm. Chim.*, 1935, 22, 166.
- (108) K. FELLINZER et K. MENKES, *Wien klin. Wochschr.*, 1933, 46, 133.
- (109) W. KÜSTER, *Z. physiol. Chem.*, 1909, 59, 63.
- (110) W. KÜSTER, *Z. physiol. Chem.*, 1915, 94, 137.
- (111) L. PINCUSSEN, in *Oppenheimer, Hand. d. Bioch.*, 1925, 2° éd., 5, p. 560.
- (112) VIERORDT, *Die Anwendung des Spektralapparates zur Photochemie der Absorptionsspectren zur Kantitativen chemischen Analyse. Tübingen* 1873.
- (113) KÜNKEL, *Pflüger's Arch.*, 14, 353, cité par Vossius (114).
- (114) VOSSIUS, *Arch. exp. Pathol. Pharm.* 1879, 11, 427.
- (115) FRANKE, *Z. ges. exp. Med.*, 1931, 79, 107 ; *Chem. Zentr.* 1932, 1, 2873.
- (116) L. JENDRASSIK et R.-A. CLEGHORN, *Biochem. Z.*, 1937, 289, 438 ; 1936, 289, 1.
- (117) E.-A. PETERMAN et T.-B. COOLEY, *J. lab. clin. med.*, 1934, 19, 723.
- (118) HOOPER et WHIPPLE, *Amer. J. physiol.*, 1916, 40, 332.
- (119) JOLLES, *Z. physiol. Chem.*, 1899, 27, 83.
- (120) BOUMA, *Deutsch. med. Wochschr.*, 1904, 881.
- (121) SCHILLING, *Klin. Wsch.*, 1923, 1552.

- (122) KNUTT E.-E., HAWLEIN W.-B., et WHIPPLE M.-D., *J. exp. Med.*, 1935, 61 (1), 127.
- (123) HUNTER, *Chem. Zentr.*, 1931, 1, 820.
- (124) A. GRECO, *Diagn. e Tcn. lab.*, 1931, 2, 925.
- (125) M.-S. NICHOLS et J.-W. JACKSON, *J. lab. Clin. Med.*, 1930, 15, 672.
- (126) B.-W. RHAMY et P.-H. ADAMS, *J. lab. clin. Med.*, 1927, 13, 87.
- (127) H. FISCHER et H. BARRENSCHEEN, *Z. physiol. Chem.*, 1921, 115, 94.
- (128) H. FISCHER et F. REINDEL, *Z. physiol. Chem.*, 1923, 127, 297.
- (129) WEISS, *Wien. Arch. klin. Med.*, 1920, 1, 359 ; *Wien. klin. Wochschr.*, 1916, n° 15 ; *Erg. d. inn. Med.*, 1922, 22, 139.
- (130) R. SIVO et E. FORRAI, *Biochem. Z.*, 1927, 189, 168.
- (131) MEYER-BETZ, *Lehre v. Urobiline. Erg. d. inn. Med.*, 1913, 12, 733.
- (132) H. FISCHER et F. MEYER-BETZ, *Z. physiol. Chem.* 1911, 75, 232.
- (133) FR. MÜLLER, *Jahresber d. Schles. Gesellschaft f. vaterländische Kultur. Breslau*, 1892.
- (134) L. STRAUSS et L. HAHN, *Zbl. inn. Med.*, 1920, 41, 193.
- (135) M. SAILLET, *Revue de Méd.*, 1897, 17, 114.
- (136) CHARNAS, *Biochem. Z.*, 1909, 20, 401.
- (137) H. FISCHER, in *Oppenheimer, Biochem. Handl.* 2° éd. 1933, p. 254 sq.
- (138) ZEEHUISEN, *Wien med. Woch.*, 1889, p. 1097.
- (139) N. FIESSINGER, H.-R. OLIVIER et M. HERBAIN, *Diagnostics biologiques* 1929, Paris, Maloine Editeur p. 335.
- (140) H. LANDOLT, *Z. physiol. Chem.*, 1899, 28, 192.
-

CHAPITRE SECOND

SUBSTANCES D'ORIGINE EXOGENE (Médicamenteuse)

Outre les substances dont nous venons de nous occuper, on rencontre parfois dans l'urine les substances exogènes les plus diverses, nous voulons parler des médicaments.

De nombreuses drogues qui s'éliminent en nature ou après transformation par la voie urinaire, sont susceptibles d'être extraites par la méthode du relargage ; citons l'acide picrique, les colorants, certains alcaloïdes, le chloroforme, les dérivés de l'essence de térébenthine et du camphre, etc...

Nous n'entreprendrons pas une étude détaillée de cette élimination, réservant notre expérimentation à quelques cas particuliers.

Nous examinerons ici à titre d'exemple la caractérisation des barbituriques et de l'atophan.

I. — Caractérisation des barbituriques dans l'urine

En solution aqueuse, les barbituriques sont relargables à des concentrations diverses, qu'on peut même abaisser par acidification du milieu.

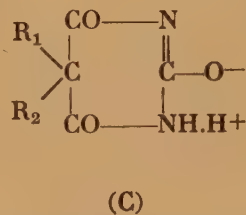
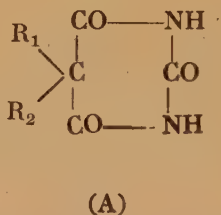
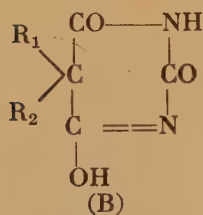
Ainsi, les concentrations limites où le sulfate d'ammonium produit le relargage sont, pour le gardénal :

en solution alcaline, un peu supérieure à 0 g. 20 ‰.

en solution acide inférieure à 0 g. 05 ‰.

Ce fait paraît en relation avec la tautomérisation possible du gardénal suivant l'acidité du milieu.

La forme non ionisée des barbituriques, qui correspond à la formule classique (A) est susceptible de se transformer, en milieu alcalin, en forme énolique (B) et en milieu acide en forme (C).



Les formes ionisées B et C, plus solubles, relarguent plus difficilement ; c'est pour un pH convenable (toutes réserves faites sur l'influence propre de l'anion) que la forme A, devenue prépondérante, permet de relarguer à la concentration la plus faible.

L'influence du pH sur le relargage du véronal apparaît nettement dans les tableaux suivants. Le signe + indique qu'il y a précipitation du barbiturique à la température ordinaire lorsqu'on sature la solution au moyen de sulfate d'ammonium.

Solution de véronal .. 1 cm ³ 5	1,2	1	0,9	0,8
à 1 g. p. 100				

Eau	1 cm ³	1,3	1,5	1,6	1,7
-----------	-------------------	-----	-----	-----	-----

SO ₄ H ₂ . 10 N.....	2 cm ³ 5	2,5	2,5	2,5	2,5
--	---------------------	-----	-----	-----	-----

Relargage	+	+	+	+	0
				(très léger)	

Tableau 1

Solution de véronal à 1 g. p. 100	1 cm ³ 5	1	0,8	0,7	0,5	0,4
Eau	1 cm ³ 5	1,5	1,7	1,8	2	2,1
SO ₄ H ₂ 5 N	2 cm ³ 5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Relargage	+	+	+	+	+	0
					(très léger)	

Tableau 2

Solution de véronal à 10 g. p. 100	2 cm ³ 5	2	1	0,75	0,60	0,50
dans NH ₄ OH au 1/5						
NH ₄ OH commerciale au 1/5 ..	2 cm ³ 5	3	4	4,25	4,40	4,50
Relargage	+	+	+	+	+	0

Tableau 3

Ces tableaux nous indiquent qu'on redissout le véronal en forçant l'acidité. Ainsi, dans SO₄H₂. 5 N (tableau 1) on ne relargue pas 1 mg. 6 de véronal par centimètre cube alors que dans SO₄H₂ 2,5 N (tableau 2) on peut en relarguer 0 mg. 8 par centimètre cube.

En milieu alcalin, on augmente au contraire la solubilité. Ainsi dans l'ammoniaque commerciale au cinquième, on ne peut relarguer dix milligrammes de véronal par centimètre cube (tableau 3).

Il semble bien d'ailleurs que même pour un pH convenable correspondant en quelque sorte au point isoélectrique du véronal, le relargage intégral de ce composé ne puisse avoir lieu. C'est pourquoi il n'était pas question d'utiliser ce mode d'isolement pour pratiquer un dosage. Mais, pour une recherche qualitative,

à condition que la concentration soit suffisante, le procédé semblait séduisant.

Nous aurions pu d'ailleurs améliorer beaucoup le rendement de l'extraction en conjuguant le relargage et l'extraction par un solvant devenu non miscible à l'eau par son propre relargage (l'alcool par exemple). Mais, comme il existe de nombreuses méthodes qualitatives, FABRE (9 bis), DESODT (7), etc..., et que certaines donnent toute satisfaction, nous n'avons pas cherché dans cette voie à réaliser une technique nouvelle.

Par contre, quand il s'agit de l'identification rapide d'un barbiturique dans l'urine, il y a place pour une méthode pratique car le laboratoire hospitalier nous a montré que l'on n'a pas, dans ce domaine, de moyen bien satisfaisant. Lorsqu'on amène à l'hôpital un malade dans le coma, chez lequel on suppose une intoxication par un somnifère, la concentration du toxique que l'on peut trouver dans les urines prélevées par catéthérisme est toujours élevée et le médecin a besoin de connaître dans le moindre délai, si le poison est un barbiturique afin d'instituer la médication strychnée intensive, qui permet assez souvent de sauver le malade. Il s'agit donc moins, en ces circonstances, de savoir la quantité de barbiturique et sa nature précise, que de pouvoir affirmer dans le délai d'une demi-heure par exemple, la présence de ce composé.

Les premiers essais nous ont montré qu'il était possible de retrouver un barbiturique dans le relargat d'une urine dès qu'elle en renferme plus de 0 g. 20 par litre.

D'autre part, LAGARCE (1), étudiant l'élimination du véronal chez un intoxiqué, trouve dans l'urine des premières heures une concentration de 1 g. 21 par litre, et le lendemain 0 g. 91 par litre.

Récemment F. L. TILLY (15) a reproché à notre procédé son manque de sensibilité. En vérité nous nous sommes bien gardé d'adopter une technique trop sensible, car il s'agit pour nous de ne pas confondre l'élimination d'un barbiturique ingéré à dose thérapeutique avec l'élimination massive que l'on rencontre au cours des intoxications. A la page 119 de sa thèse, TILLY donne des chiffres significatifs à cet égard. Etudiant l'élimination du véronal chez un individu auquel on administre un suppositoire contenant 0 g. 50 de ce composé, il constate que le barbiturique apparaît brutalement dans l'urine, à une concentration initiale maximum de 0 g. 186 par litre. Or, nous avons dit précédemment

que notre procédé de recherche par relargage peut s'appliquer lorsque l'urine contient plus de 0 g. 20 de barbiturique par litre.

C'est précisément un chiffre supérieur à la concentration maximum que Tilly a pu rencontrer dans son étude. Le relargage à notre avis est une méthode de choix pour caractériser une intoxication par les véronalides ; nous ne la recommandons point sous la forme adoptée, pour rechercher ces composés dans l'urine d'individus à la suite d'une administration normale (1).

Guidé par le souci de rapidité, nous avons établi le mode opératoire suivant :

Nous examinerons successivement le principe puis la technique des trois étapes de la caractérisation : 1° l'extraction, 2° la purification, 3° l'identification.

1° Extraction

a) *Principe.* — Pour aller vite, il faut renoncer à l'extraction par un solvant non miscible précédée d'une défécation et suivie d'une évaporation. Nous avons adopté le relargage par le sulfate d'ammonium en milieu acide.

b) *Mode opératoire.* — 50 centimètres cubes d'urine sont placés dans une fiole conique de 150 centimètres cubes en Pyrex, additionnés de 35 g. de sulfate d'ammonium pulvérisés et de 2 centimètres cubes d'acide chlorhydrique concentré. On porte rapidement à l'ébullition et refroidit aussitôt sous un courant d'eau froide. Le liquide, ramené à la température ordinaire, est versé sur un entonnoir à angle de 60°, portant une petite plaque (30 mm. environ). La douille de l'entonnoir est engagée dans une fiole conique pour filtration à la trompe. Avec un papier filtre à grain fin et un bon vide, le liquide filtre limpide et le précipité est recueilli en quelques minutes. Le filtre est détaché, plié en deux, essoré entre deux feuilles de papier buvard.

2° Purification

a) *Principe.* — Nous avons utilisé le procédé le plus généralement employé : la sublimation. Renonçant aux appareils de

(1) Nous verrons plus loin qu'il est possible d'adapter le relargage à la recherche des plus minimes doses de véronalides.

chauffage plus ou moins compliqués de KEMPF (2), MORVILLEZ (3) et WAGENAAR (4), nous avons adopté, suivant les indications de M. CHARONNAT, un appareil très simple, que nous nous gardons bien de revendiquer comme original, bien qu'à notre connaissance il n'ait jamais été proposé sous cette forme (fig. 3). C'est le

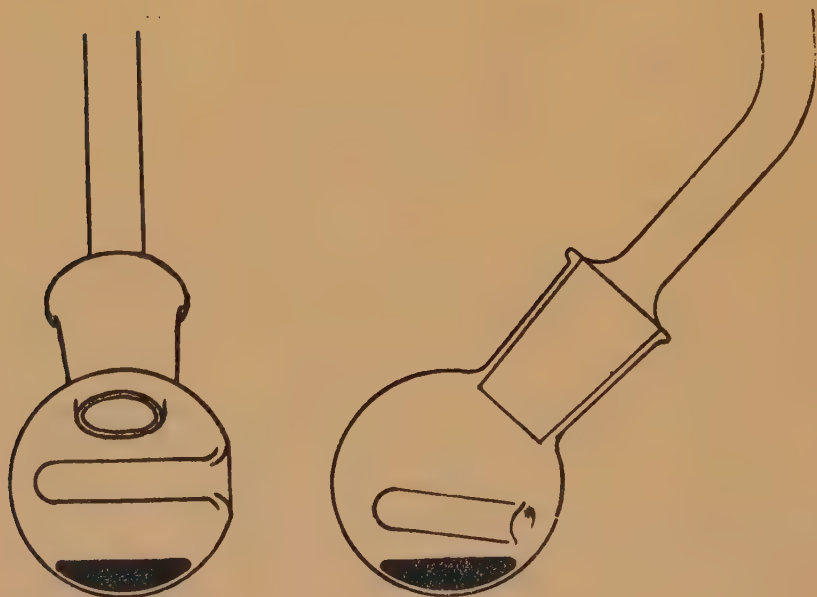


Fig. 3

ballon à saponification habituel, de 150 cm³ en Pyrex, à fond rond, qui a subi deux modifications .

a) Une coudure du tube réfrigérant (tube de 15 mm. de diamètre s'adaptant sur le ballon avec rodage normalisé).

b) La soudure suivant un diamètre perpendiculaire à l'axe, en invagination, d'un tube de Pyrex mince de 10 mm. de diamètre intérieur et 60 mm. de profondeur. Le fond du tube est libre à l'intérieur du ballon, son orifice est abouché à la surface sphérique.

C'est en somme une jaquette thermostatique où le chauffage est assuré par la vapeur d'un liquide bouillant à point fixe élevé. L'inclinaison de la partie inférieure du tube réfrigérant évite

la chute du liquide condensé sur le tube central et le refroidissement de celui-ci.

6 à 8 centimètres cubes d'un liquide à point d'ébullition élevé sont placés au fond du ballon et chauffés avec un bec Bunsen réglé pour une ébullition vigoureuse. Nous avons essayé comme liquide l'aniline, la phénylhydrazine et le mercure, qui permettent d'atteindre en quelques minutes, sur l'axe du tube intérieur, des températures fixes et voisines respectivement de 180° , 240° et 340° . Dans les tubes à sublimation décrits ci-dessous, et dans un temps limité à 10 minutes, le véronal se sublime seul si on emploie l'aniline; le véronal et le dial se subliment avec la phénylhydrazine; le soneryl, la rutonal, le gardénal, exigent l'emploi de vapeurs de mercure.

b) *Mode opératoire.* — La sublimation est réalisée dans le vide, à l'intérieur d'ampoules préparées de la façon suivante. On choisit un tube de verre mince de 8 mm. de diamètre, qu'on débite en morceaux de 20 cm. de longueur. Ces morceaux sont soigneusement lavés puis séchés. On repère leur milieu M et, à l'aide d'une flamme, on réalise des étranglements A et B de 4 mm. environ de diamètre, à 15 mm. de part et d'autre de la moitié du tube (fig. 4), on ferme ensuite, et sépare les deux ampoules.



Fig. 4

On introduit dans l'une d'elle un petit tampon *b* modérément serré de fibres d'amiante desséchée à 150° , qui isole une petite chambre à sublimation, puis le filtre portant le relargat et découpé en lanières, derrière lequel on pousse un second tampon d'amiante *d* analogue au premier; la distance entre *b* et *d* doit être de 45 mm. environ; on étire le tube derrière le second tampon (fig. 5). L'étranglement, sur lequel on a ramené, dans la



Fig. 5

flamme, un peu de verre pour augmenter sa solidité, ne doit pas avoir moins de 3 mm. intérieur.

On adapte alors l'orifice du tube à une trompe à eau et on établit un vide de quelques centimètres de mercure. Si l'on veut réaliser rapidement le vide à l'intérieur du tube, il faut veiller à ce que les étranglements ne soient pas trop petits ni les tampons trop serrés. On ferme ensuite l'ampoule sous vide à l'aide d'une flamme à dard fin.

L'ampoule est placée immédiatement dans le tube du ballon où le mercure bout déjà. La petite chambre à sublimation *a* est maintenue à l'extérieur du ballon et entourée d'une petite selle de papier filtre mouillé sur laquelle on fait tomber de temps en temps quelques gouttes d'eau pour la tenir humectée. Dans cette chambre à paroi froide, vient se condenser le sublimé.

Avec le véronal, la sublimation en fines aiguilles, est déjà importante au bout d'une minute. Le dial se sublime plus difficilement et cristallise aussi. Le soneryl, le rutonal et le gardénal apparaissent plus tardivement et se condensent sous forme de gouttelettes huileuses qui restent vitreuses et transparentes. Ceci est déjà une indication en faveur de l'un ou l'autre des dérivés barbituriques.

Lorsque le vide a été correctement fait dans l'ampoule celle-ci résiste au chauffage brutal. Si le vide a été mal fait l'ampoule peut éclater ; en employant du verre très mince et en plaçant la chambre à sublimation du côté opposé à l'observateur par rapport au ballon, on évite tout risque au moment de l'éclatement.

A défaut de notre appareil spécial de chauffage, on peut utiliser le bloc de Maquenne qui sert couramment dans les laboratoires pour la détermination du point de fusion instantané. Dans le tube intérieur du bloc, on place l'ampoule, chambre de condensation au dehors, un thermomètre à l'opposé. L'obtention de température élevées est plus lente et le réglage plus difficile.

3° Identification

a) *Principe.* — Les véronalides n'étant pas les seules substances capables de se sublimer dans ces conditions, on ne peut tenir pour significative l'apparition d'un produit de condensation dans la chambre refroidie. Laissant de côté la précipitation par le sulfate acide de mercure, trop peu spécifique, nous avons retenu la réaction colorée de PARRI (5) assez sensible et assez caractéristique.

En solution aqueuse, le véronal donne, avec un sel de cobalt

et sous l'action de l'ammoniaque, une magnifique coloration violette, instable en présence d'un excès d'alcali. Cette instabilité est moindre si l'on fait la réaction en milieu alcoolique.

Son auteur avait remarqué que la saccharose donnait une réaction analogue, à la condition toutefois de substituer un alcali fixe à l'ammoniaque.

ZIMMERMAN (6) a donné une réaction colorée identique pour l'histamine.

D'autre part, des améliorations (ou prétendues telles) diverses de la réaction de PARRI, ont été proposées par DESODT (7) qui ajoute un cyanure, par le colonel BOBIER (8) qui fait une oxydation du cobalt au moyen du perhydrol en milieu alcalin en présence de cyanure, par ZWIKKER (16), BODENDORF (17) qui remplacent l'ammoniaque par la potasse ou la baryte alcoolique et opèrent en solution méthylique, par KOPPANYI (9) et ses collaborateurs, qui opèrent en milieu chloroformique avec la baryte, la lithine ou des bases organiques et obtiennent une teinte différente ; enfin, l'instabilité du complexe en milieu aqueux diminue en milieu alcoolique et mieux encore glycérolé ; tous ces faits appelaient une étude qui fera l'objet d'un autre chapitre (cf. p.83).

Cette étude nous a conduit au mode opératoire suivant :

b) *Mode opératoire.* — La chambre de condensation du tube à sublimation est détachée à l'aide d'un trait de lime ; on ouvre de la même façon son autre extrémité et jette les deux morceaux dans un tube à essais.

On arrose avec 1 cm³ de méthanol absolu qui dissout rapidement le véronalide ; on ajoute une goutte de solution méthylique récente d'acétate, de chlorure ou de nitrate de cobalt à 5 p. 100, et goutte à goutte une solution méthylique de gaz ammoniac à 3 p. 100. Il se forme instantanément une coloration violette ; pour distinguer l'effet de faibles doses de véronalide de la légère coloration rose propre aux sels cobalteux, on compare avec un tube témoin préparé simultanément avec le méthanol et les autres réactifs.

Remarque

Nous avons pu caractériser ainsi dans l'urine 0 g. 20 par litre de véronal ou de gardénal ajoutés en solution alcaline. Des doses plus faibles d'hypnotique échapperont à l'identification et

l'on ne risque pas de considérer comme toxiques les véronalides ingérés à dose thérapeutique.

La technique ci-dessus peut d'ailleurs être adaptée à la recherche des doses les plus faibles des dérivés barbituriques quand on n'est plus limité par la petitesse du prélèvement, par le temps, et qu'on peut effectuer sur le sublimé des réactions microchimiques.

Elle se prête en outre, avec une réaction d'identification appropriée, à la recherche d'autres médicaments relargables et sublimables.

CHAPITRE SPÉCIAL

ETUDE DE LA REACTION DES DERIVES BARBITURIQUES AVEC LES SELS COBALTEUX

Nous avons procédé à deux sortes d'essais :

a) *Qualitatifs* c'est-à-dire que nous avons recherché dans quelles limites la réaction de PARRI peut être considérée comme spécifique.

b) *Quantitatifs* c'est-à-dire que nous avons étudié la constitution moléculaire de quelques composés formés.

Etude qualitative

KOZELKA et TATUM (18) ont pu récemment montrer sa généralisation aux substances dans lesquelles on rencontre deux ou un groupement imide non substitué, la stabilité de la coloration étant nettement moindre dans le second cas.

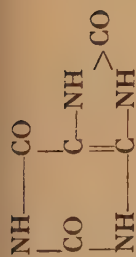
Nous avons vu plus haut que, de l'avis même de son auteur, la réaction de PARRI était donnée par des substances sans analogie chimiques entre elles.

Pour avoir une idée du ou des groupements d'atomes auxquels elles étaient susceptibles de s'appliquer, nous avons effectué systématiquement les réactions de PARRI (en milieu aqueux, méthylique ou glycérolé), de KOPPANYI et de ZIMMERMANN, d'abord avec des barbituriques ou des composés de structure analogue, puis avec divers sucres, enfin avec d'autres corps dont la molécule nous semblait pouvoir se prêter aux mêmes réactions.

Le tableau suivant résume l'essentiel de ces recherches, le signe + indique une réaction positive, c'est-à-dire généralement une coloration violette. Le signe 0 indique une réaction négative, c'est-à-dire pas de coloration violette, mais un précipité d'hydrate de cobalt, ou bien pas de précipité du tout ou bien encore une coloration quelconque mais non violette.

		RÉACTION DE PARRI	RÉACTION DE KOPPANYI	RÉACTION DE ZIMMERMANN
Véronal (et tous les barbituriques)	$ \begin{array}{c} \text{CO}-\text{NH} \\ \\ \text{H}_5\text{C}_2 > \text{C} \\ \\ \text{H}_5\text{C}_2 \\ \\ \text{CO}-\text{NH} \end{array} $	+	+	+
Acide barbiturique	$ \begin{array}{c} \text{CO}-\text{NH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CO}-\text{NH} \end{array} $	+ (— stable)	+	+
Alloxane	$ \begin{array}{c} \text{CO}-\text{NH} \\ \\ \text{CO}-\text{CO} \\ \\ \text{CO}-\text{NH} \end{array} $	+	+	+
Acide cyanurique	$ \begin{array}{c} \text{CO}-\text{NH} \\ \\ \text{NH}-\text{CO} \\ \\ \text{CO}-\text{NH} \end{array} $	+	+	0
Allantoïne	$ \begin{array}{c} \text{NH}-\text{CO} \\ \\ \text{CO}-\text{NH}-\text{CH}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{NH}-\text{CH}_2 \\ \\ \text{CO}-\text{NH}-\text{CO} \end{array} $	+	0 (insoluble)	0
Hydantoïne	$ \begin{array}{c} \text{NH}-\text{CO} \\ \\ \text{CO}-\text{NH}-\text{CO} \end{array} $	+	+	0

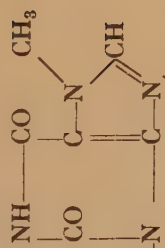
Acide urique



O
(insoluble)

+

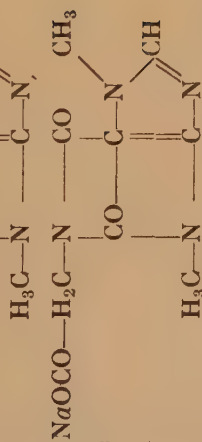
Théobromine



+

+

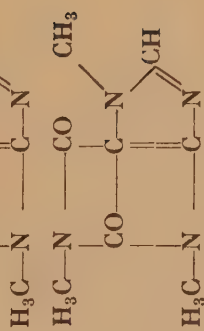
Técarine



0

0

Caféine



0

0

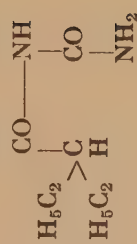
Biuret



0

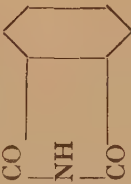
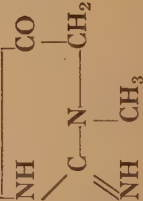
O

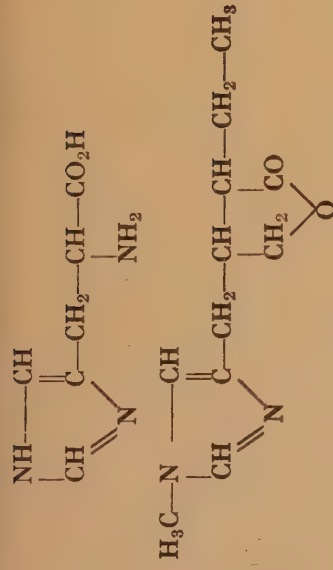
Diéthylacétylurée



0

0

		RÉACTION DE FARRI	RÉACTION DE KOPPANYI	RÉACTION DE ZIMMERMANN
<i>Succinimide</i>		+	+	
<i>Phthalimide</i>		+	+	
<i>Isatine</i>		0	0	
<i>Cryogénine</i>		0	0	
<i>Dibenzamide</i>		0	0	
<i>Créatinine</i>		0	0	+



Pilocarpine

Glucose

Lévulose

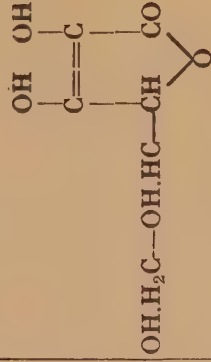
Saccharose

Lactose

Mannite

Inosite

Acide ascorbique



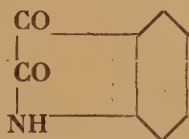
0	0	(col.brune)	0	(col.brune)	0	0	+
0	+		+		0	0	+
+	+		+		0	0	+
+	+		+		0	0	+
+	+		+		0	0	+
0	0		0		0	0	+
0	0		0		0	0	+
+	+		+		0	0	+

Ce tableau nous montre que certains composés ayant une analogie de structure moléculaire donnent la réaction. Ainsi, les barbituriques, l'alloxane, l'acide cyanurique, l'allantoïne, l'hydantoïne, la théobromine, la succinimide, la phthalimide, corps possédant tous le groupement — CO — NH — CO — donnent une coloration violette avec les sels cobalteux.

De plus, tandis que la phthalimide donne la réaction, l'isa-



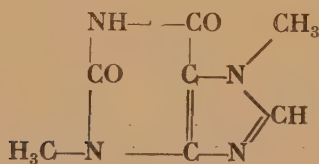
Phthalimide



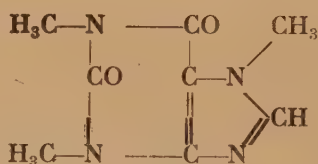
Isatine

tine en est incapable, le mode de liaison des atomes dans le groupement précité est donc fort important.

D'autre part, tandis que l'acide urique ou la théobromine peuvent donner un complexe, la caféine ou la técarine n'en sont plus capables.



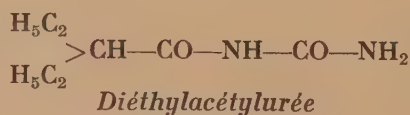
Théobromine



Caféine

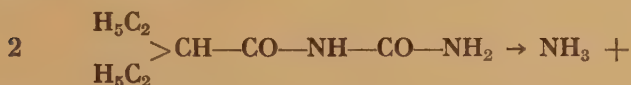
Le phénomène est lié à la disparition d'un hydrogène mobile situé à côté d'un carbonyle.

Mais cette condition nécessaire, n'est pas suffisante puisque la diéthylacétylurée, bien que possédant cet hydrogène mobile entre deux carbonyles ne peut donner la réaction, comme si le groupement terminal s'opposait au jeu de l'ensemble CO — NH — CO — .



Si l'on pyrolyse doucement la diéthylacétylurée, on constate

un départ de vapeurs ammoniacales. Entre autres se fait vraisemblablement la réaction suivante :



et le produit de cette pyrolyse, repris par le méthanol, donne en effet une magnifique réaction de PARRI.

On peut d'ailleurs faire les mêmes observations avec la cryogénine et l'urée, nous reviendrons sur ce point dans un autre travail.

En résumé, pour la série des amides que nous venons d'examiner, la possibilité de formation d'un complexe violet dans la réaction de PARRI est liée à l'existence d'un groupe $\text{CO} - \text{NH} - \text{CO}$ — mais la liaison de l'un des carbonyles avec un NH_2 (diéthylacétylurée) ou avec un C_6H_5 (dibenzamide), annule cette aptitude. Comment interpréter ces observations ?

On peut imaginer que la réaction est possible à cause de la tautomérisation $— \text{CO} - \text{NH} - \text{CO} — \rightarrow \text{C}(\text{OH}) = \text{N} - \text{CO} —$ l'H de l'oxydride devenant remplaçable par du cobalt pour former un sel de cobalt très banal. Le second $— \text{CO} —$ ne serait nécessaire que pour exalter la mobilité et l'acidité de cet atome d'hydrogène. Ceci n'explique pas, toutefois, que le sel de cobalt obtenu dans la réaction de PARRI ait une coloration violette, si intense, toute différente de celle des composés cobalteux ammoniacaux.

Une molécule nous offre l'exemple d'un $— \text{NH} —$ dont l'hydrogène est devenu très acide à cause de substitutions fortement électronégatives, c'est l'hexanitrodiphénylamine



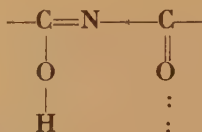
dont le sel d'ammonium



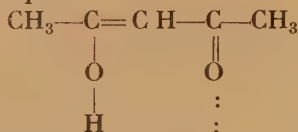
est employé comme matière colorante sous le nom d'aurantia.

Cette substance ne donne pas la réaction de PARRI, le — NH —
acide n'est donc pas à lui seul, l'agent de la réaction contrairement à ce que pensaient KOZELKA et TATUM.

Il semble que dans la tautomérisation invoquée ci-dessus, le second — CO — intervient comme porteur, sur son oxygène, d'une valence résiduelle capable d'assurer aussi la coordinance du cobalt



jouant le même rôle que



dans les acétylacétonates complexes (WERNER (12)).

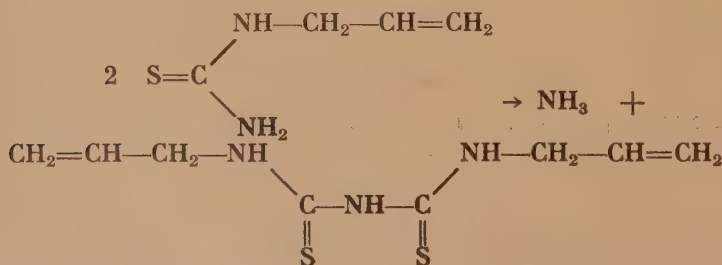
Un deuxième type de réaction semble fourni par les sucres dont la molécule non azotée donne des complexes moins stables et peu colorés il est vrai.

Inosite et mannite ne réagissant pas, il est probable que la condensation se fait par un oxhydrile lié au carbone porteur de la fonction aldéhydique ou cétonique.

Enfin, la créatinine, donnant une magnifique coloration bleue, même en l'absence d'alcali, nous a semblé jouer un rôle un peu spécial et offrir un troisième type de réaction.

La substitution d'un atome de soufre à un atome d'oxygène dans le groupe réactionnel, fait apparaître une coloration verte et non plus violette.

Ainsi la pyrolyse de la thiosinamine amenant selon toute vraisemblance par perte d'ammoniac à la réaction



conduira à un composé qui, en solution méthylique, après élimination de SH_2 , donnera avec un sel cobalteux en milieu alcalin un beau complexe vert.

Etude quantitative

Nous avons cherché à isoler quelques-uns des complexes colorés formés au cours de ces réactions en vue d'établir leur formule et leur constitution.

Préparation de quelques complexes cobalteux

1° Complexes du véronal, du gardénal.

Le barbiturique est dissous à froid dans le minimum d'eau en présence d'un excès d'ammoniaque. Nous utilisons par exemple

Véronal	9 g 20
Eau	15 cm ³
Ammoniaque officinale	10 cm ³

Puis on ajoute goutte à goutte une solution très concentrée de sulfate de cobalt (dans son poids d'eau) jusqu'à ce qu'un excès de sel de cobalt n'amène plus de précipitation. On obtient d'emblée un magnifique dépôt cristallin violet intense qui, essoré à la trompe, lavé rapidement à l'acétone, est séché à l'étuve à 100°.

Le complexe du gardénal, moins stable, est plus difficile à préparer ; il est souvent souillé d'oxyde de cobalt.

2° Complexe de Pilocarpine.

On dissout à chaud 2 g. de chlorydrate de pilocarpine dans 2 cm³ d'eau.

Puis on ajoute 0 cm³ 6 de solution concentrée de chlorure de cobalt dans le méthanol (10 g. $\text{Cl}_2\text{Co. 6 OH}_2$ dans 10 cm³ de méthanol), et enfin 4 cm³ d'ammoniaque officinale diluée au 1/10°.

On obtient un magnifique précipité cristallin violet qui est essoré et lavé comme le précédent.

3° Préparation du complexe de la créatinine.

On dissout à chaud

Chlorhydrate de créatinine	1 g.
Eau	0 cm ³ 5

puis on ajoute 10 cm³ de méthanol chaud, et 0 cm³ 7 de la solution concentrée précédente de chlorure de cobalt dans le méthanol. Enfin 3 cm³ 5 de solution méthylique d'ammoniac à 3 g. 5 p. 100.

On obtient d'emblée un magnifique précipité bleu ciel qui, lavé avec du méthanol bouillant puis du chloroforme, peut ensuite être séché à l'étuve à 100°.

4° Complexe du véronal préparé conformément à la réaction de Koppanyi .

On triture au mortier :

Lithine caustique 1 g. 20

Véronal 4 g. 60

et dissout progressivement dans 25 cm³ de méthanol bouillant puis on refroidit la solution et filtre. On ajoute ensuite 3 cm³ de la solution méthylique concentrée de chlorure de cobalt précédemment décrite. On obtient un précipité bleu lilas, qui est essoré, lavé avec un peu de méthanol, puis d'éther et enfin desséché à l'étuve.

Sa coloration lilas pâle à sec, passe au violet intense lorsqu'on l'humecte avec l'éther ou le chloroforme.

5° Complexe des sucres.

Nous n'avons pas réussi jusqu'à présent à préparer régulièrement à l'état cristallisé les complexes cobalteux des sucres en quantité suffisante.

Etude des propriétés et de la composition chimique de ces complexes

1° Complexes de barbituriques préparés selon la réaction de Parri.

Le complexe du véronal se présente comme une poudre cristalline de coloration violet mauve à la lumière solaire et violet cardinalice à la lumière électrique. Au microscope, on peut voir qu'il est fait de petits prismes violets. Il est stable à l'étuve à 100° lorsqu'il est sec et n'y perd pas d'eau.

Il est détruit par l'eau, avec précipitation de véronal, tandis que le cobalt passe en solution aqueuse. Il se comporte de même avec tous les solvants contenant une certaine proportion d'eau ; tandis que dans les solvants anhydres (éthanol, acétone, glycérol),

il est soluble et fort stable. Tous les liquides dans lesquels ses constituants sont insolubles sont sans action sur lui, même à la température du bain-marie (éther de pétrole, sulfure de carbone). Quel que soit le sel de cobalt d'où l'on est parti, le complexe obtenu est toujours le même, nous avons en effet vérifié qu'il ne contient pas trace de l'anion du sel métallique utilisé.

Nous avons dosé les divers constituants : le cobalt par simple calcination en milieu sulfurique et pesée à l'état de SO_4Co .

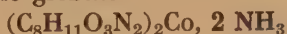
Le véronal par extraction chloroformique de la solution du complexe dans l'acide sulfurique dilué. L'évaporation du chloroforme donne un résidu de barbiturique que l'on pèse.

La solution aqueuse résiduelle contient l'oxyatophan qu'on l'on dose après déplacement et distillation, par acidimétrie.

Résultats

	Moyenne des résultats	Théorie pour la formule ci-dessous
Cobalt	12.96	12.85
Véronal	77.97	80.17
Ammoniac	6.61	7.40

Ces résultats correspondent à un véronalate de cobalt diamminé, soit à la formule globale



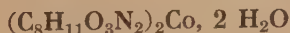
Le complexe gardénalique a une formule identique et nous avons vérifié sa teneur en cobalt 11, 04 % pour un chiffre théorique de 11,63 %.

2° Complexes de barbituriques préparés conformément à la réaction de Koppányi.

Nous avons dosé le cobalt et le véronal par les procédés cités pour les complexes précédents.

	Moyenne des résultats expérimentaux	Théorie
Cobalt	12.47	12.26
Véronal	82.29	79.82

ceci correspond à un véronalate de cobalt dihydraté



3° Complexes de la pilocarpine et de la créatinine.

Ces complexes présentent avec les précédents, une différence nette. En effet, leur molécule conserve l'anion du sel cobalteux originel, dans le cas présent le chlore, alors que dans les complexes barbituriques, l'uréide s'est intégralement substitué à cet anion.

Nous avons dosé ce chlore par la méthode Charpentier-Volhard dans une solution sulfurique de complexe.

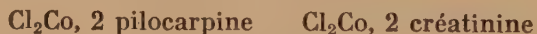
Le cobalt a été précipité par le sulfure d'ammonium dans la solution aqueuse du complexe, puis pesé à l'état de SO_4Co comme précédemment.

La pilocarpine a été titrée d'après la méthode générale de MARICQ (10) selon la technique de GALLAIS (11).

Enfin, la créatinine a été appréciée colorimétriquement par comparaison avec une solution titrée de créatinine en employant la classique réaction colorée de Jaffé, voici les résultats :

	Moyenne des résultats expérimentaux	Théorie
Complexe de pilocarpine :		
Cobalt	10.38	10.80
Chlore	14.74	13
Pilocarpine ..	74.88	76.19
Complexe de créatinine :		
Cobalt	15.14	16.56
Chlore	20.66	19.94
Créatinine ...	62.03	63.48

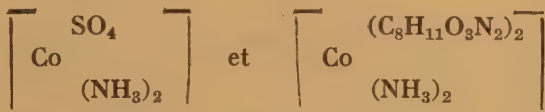
ceci correspond aux formules suivantes :



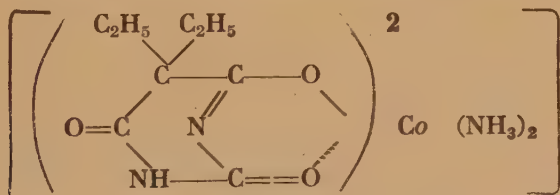
Essai de coordination de ces combinaisons complexes

On ne connaît guère de sels de cobalt diammoniés avec anion minéral oxygéné qui puissent nous servir, quant à la couleur, de terme de comparaison avec le véronalate de cobalt diammoniacal. A vrai dire, on ne connaît même que le sulfate $\text{SO}_4\text{Co}, 2 \text{ NH}_3$ qui s'obtient par chauffage entre 136° et 254° d'un sulfate plus riche en ammoniac. Il est violet, mais de teinte différente de celle du complexe formé dans la réaction de PARRI. Les deux ions vérona-

liques monovalents joueraient donc le même rôle que l'ion divalent SO_4^{--} et les deux complexes pourraient être formulés comme non électrolytes avec Co tétracoordonné.



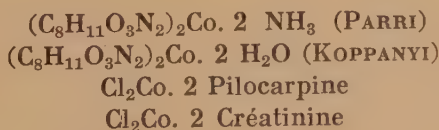
Toutefois, l'intervention nécessaire du second — CO — (cf. p. 89) dans le groupement d'atomes du véronal qui est l'agent de formation du complexe de la réaction de PARRI, nous fait croire que chaque reste véronalique n'est pas monocoordinant mais dicoordinant et que la coordinance du cobalt dans notre combinaison n'est pas 4 mais 6. Ce fait semblant en relation avec la teinte spéciale du complexe de PARRI, cette coordinance est d'ailleurs la plus fréquente pour les combinaisons cobalteuses, le sulfate de cobalt ammoniacal qui se forme spontanément par action de l'ammoniac sur le sulfate anhydre étant $\text{SO}_4 [\text{Co}(\text{NH}_3)_6]$ rose. Nous adoptons finalement (sous réserve de recherches ultérieures), pour le complexe de la réaction de PARRI la formule



et une formule analogue où H_2O remplace NH_3 pour le complexe de la réaction de KOPPANYI.

Remarques sur la coordination de ces combinaisons complexes

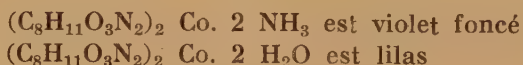
Les complexes que nous avons analysés



sont de formules très semblables, et du type $\text{X}_2\text{Co}. 2 \text{ B.}$

X étant un ion monovalent et B une base monovalente, de l'ammoniac par exemple ou bien une molécule d'eau. Nous avons relevé dans la littérature un complexe du même type avec l'aniline.

Ceci ne doit pas faire illusion sur leur constitution réelle, car la couleur qui révèle souvent la moindre isomerie dans les combinaisons complexes, diffère ici beaucoup d'un complexe à l'autre. Nous rappelons que



$\text{Cl}_2\text{Co. } 2$ pilocarpine et $\text{Cl}_2 \text{ Co. } 2$ créatinine sont bleu foncé. Les méthodes habituellement suivies pour établir la constitution des complexes (conductivité, nombre de transports, électrophorèse), ne sont pas applicables ici, nos combinaisons étant très instables vis-à-vis des milieux aqueux ; nous sommes donc réduit à raisonner sur la couleur des combinaisons et surtout sur les transformations mutuelles.

Le complexe lilas de la réaction de KOPPANYI, traité par une solution d'ammoniac dans le méthanol, prend immédiatement la couleur violet foncé du complexe de la réaction de PARRI ; l'ammoniac se substitue à l'eau avec la plus grande facilité, ce qui est très général dans les combinaisons complexes. Le composé formé dans la réaction de KOPPANYI doit donc avoir la même constitution que celui qui se forme dans la réaction de PARRI, deux molécules d'eau y prenant la place de deux molécules d'ammoniac, ce qui se traduit par une légère variation de la couleur.

Tandis que la combinaison $\text{Cl}_2\text{Co. } 2$ aniline, comparable en tous points à notre complexe de pilocarpine, se forme par simple broyage de l'aniline et du chlorure cobalteux cristallisé, $\text{Cl}_2 [\text{Co. } 6 \text{ H}_2\text{O}]$, on n'obtient rien de semblable lorsqu'on traite le complexe de la réaction de KOPPANYI par l'aniline. Cette base est pourtant susceptible de jouer, dans une combinaison complexe, le même rôle que l'ammoniac ; il faut en conclure que les deux ions véronaliques du complexe ne jouent pas le même rôle que les deux ions chlore.

La liaison du cobalt au chlore a un rôle prépondérant dans la couleur bleue car on sait que la couleur violette des cristaux de chlorure cobalteux (hexaquo), passe au bleu dès que la teneur

en eau tombe à deux molécules, dès qu'on a formé la combinaison $\text{Cl}_2\text{Co} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$. (R. WEINLAND (13)). Il n'en est pas de même avec un sel comme $(\text{NO}_3)_2\text{Co} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ qui est rouge.

Causes d'erreur dans la caractérisation des barbituriques

Les considérations précédentes qui paraissaient s'éloigner du relargage et de la caractérisation des barbituriques ne nous font pas perdre de vue le but de notre étude — et c'est pour bien marquer les limites de la spécificité de la réaction de PARRI que nous nous sommes laissé entraîner à examiner diverses combinaisons cobalteuses de produits biologiques ou médicamenteux.

Nous devons craindre les substances qui sont à la fois relargables et sublimables. L'urée qui pourrait nous donner par pyrolyse des substances conduisant à une réaction de PARRI positive (mais bleue), ne relargue pas. Dans l'urine, nous ne pouvons guère rencontrer que des bases puriques comme la théobromine et la caféine ; comme les barbituriques, elles relarguent et se subliment. La caféine ne donne pas la réaction de PARRI telle que nous la pratiquons. Reste la théobromine. On ne risque guère de la rencontrer dans l'urine à une concentration comparable à celle d'un barbiturique après une intoxication. S'il y avait doute de ce côté, il serait facile d'éliminer cette cause d'erreur ; une goutte de la solution du sublimat mise en solution chlorhydrique donnerait un précipité notable avec l'acide phosphotungstique ou avec le réactif de Draggendorff frais.

Nous avons constaté récemment (14). mais nous ne pouvons nous étendre ici sur ce point, que le véronal en solution très chlorhydrique et seulement dans ces conditions, donne, avec un réactif de BOUCHARDAT concentré, un précipité cristallin de période de formule



qui traduit la possibilité pour les acides barbituriques, d'exister sous une forme basique.

Il n'y a pas et il ne peut y avoir de réaction spécifique des acides barbituriques, car leur groupement caractéristique est assez banal, mais on peut affirmer leur présence avec certitude lorsqu'on a observé les propriétés suivantes :

- a) Relargage par le sulfate d'ammonium ;
- b) Sublimation ;
- c) Réaction de PARRI positive ;

d) Formation de périodure seulement en milieu chlorhydrique très concentré ;

e) Absence des autres réactions des alcaloïdes.

Dans un article récent, PESEZ (19) étudiant un barbiturique relativement nouveau, le N méthyl éthyl phénylmalonylurée (pro-minal ou isonal du commerce) signale que, pour lui, « les réactions en milieu alcoolique de PARRI, de PAGET et DESODT, de BOBIER, de ZWIKKER et BODENDORF, de KOPPANYI et de l'auteur se sont toutes montrées négatives ».

Le fait nous semblait surprenant, attendu que ce dérivé possède le groupement d'atomes —CO—NH—CO— indispensable, ainsi que nous l'avons vu plus haut (cf. p. 89).

Nous avons vérifié que ce composé donne un complexe violet intense avec les sels de cobalt, exactement comme les autres barbituriques et en particulier son voisin l'évipan, à condition d'opérer en milieu alcoolique strictement anhydre, c'est-à-dire, dans les conditions mêmes que nous avons préconisées (cf. p. 81).

Toutefois, la réaction de KOPPANYI en milieu chloroformique même anhydre est très fugace. Le complexe cobalteux donné par ce composé se distingue donc par une grande instabilité.

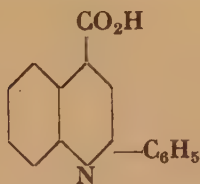
BIBLIOGRAPHIE

- (1) LAGARCE, *Thèse Pharm.* Paris 1930.
- (2) KEMPF, *Z. anal. Chem.*, 1923, 62, 284.
- (3) MORVILLEZ et DUFOURT, *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1928, 66, 254.
- (4) WAGENAAR, *Z. anal. Chem.*, 1929, 79, 44.
- (5) W. PARRI, *Boll. Chim. Farm.*, 1924, 63, 403.
- (6) ZIMMERMANN, *Z. physiol. Chem.*, 186, 260.
- (7) DESODT, *Thèse Pharm. Nancy*, 1932.
- (8) BOBIER, *Bull. Soc. Chim. France*, 1^{er} avril 1936, n° 77.
- (9) KOPPANYI, *J. of am. pharm. assoc.*, 1934, 11, 1079 ; *Arch. intern. Pharm. Therap.*, 1933, 46, 76 ; *J. of Am. Pharm. assoc.*, 1935, 24, 247 ; *J. Pharmacol. exp. Therap.*, 1934, 52, 121-129 ; 1935, 54, 84 ; 1935, 55, 46, 62.
- (9 bis) R. FABRE, *J. Pharm. Chim.*, 1922, 26, 249.
- (10) MARICQ, *Bull. Soc. Chim. Belgique*, 1931, 40, 369.
- (11) F. GALLAIS, *Thèse doct. Univ. Pharm. Paris*. 1935.
- (12) A. WERNER, *euere Auschaungen auf dem Gebiete der Anorganischen Chemie*, 5^e éd., revue par P. Pfeiffer, Brunswick 1923, p. 297.
- (13) R. WEINLAND, *Einführung in d. Chemie d. Komplexverbindungen Stuttgart*, 1924, p. 204.

- (14) R. CHARONNAT et M. LACHAUX, *J. Pharm. Chim.*, 1937, 26, 421.
 - (15) F.-L. TILLY, *Les Barbituriques*, thèse pharm. Nancy, 1937.
 - (16) ZWIKKER, *Pharm. Weekbl.*, 1931, 68, 975.
 - (17) BODENDORF, *Arch. Pharm.*, 1932, 270, 29.
 - (18) F.-L. KOZELKA et H.-J. TATUM, *J. Pharm. Exp. théér.*, 1937, 59, 54.
 - (19) M. PESEZ, *Pharmacie française*, février 1938, 42^e année, p. 74.
-

II. — Etude de l'élimination urinaire de l'atophan

L'atophan ou cinchopène est l'acide 2 phénylquinoléine 4 carbonique



C'est un médicament de plus en plus utilisé dans la thérapeutique du rhumatisme. Il agit de la façon la plus évidente, comme excitant de l'excrétion de l'acide urique, aussi bien par la voie urinaire que par la voie biliaire (1). C'est en outre un cholérétique remarquable.

En dépit de son emploi journalier et des actions si nettes de ce médicament, on a relativement peu d'indications sur sa destinée dans l'organisme et sur la vitesse de son élimination.

Il serait intéressant, pour l'étude de la cholérèse atophanique, de connaître le taux du partage entre les voies biliaires et urinaires du médicament ou de ses produits de transformation. Nous n'avons trouvé là-dessus, aucun renseignement tandis que la solution du problème est demandée de divers côtés.

D'autre part, il semble bien que la majeure partie de l'atophan subisse dans le foie ou d'autres tissus, des transformations

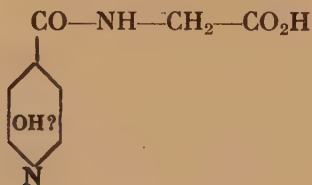
plus ou moins profondes. Les quelques mémoires publiées sur cette question sont d'ordre médical et renferment peu de renseignements techniques sur les moyens d'isolement utilisés, sur la caractérisation spécifique de l'atophan ou de ses dérivés, et encore moins d'une évaluation quantitative.

Anciens procédés d'isolement et produits extraits

Les premiers NICOLAÏER et DOHRN (1 *bis*), indiquent un procédé d'extraction du dérivé atophanique éliminé par l'urine après ingestion d'atophan (3 g. en trois jours).

L'urine (des trois jours) est d'abord fortement concentrée par chauffage, puis le résidu, précipité par cinq volumes d'alcool, conduit à une solution alcoolique que l'on distille dans le vide. L'extrait est repris par l'alcool chaud, auquel on ajoute ensuite de l'éther. La solution abandonnée à l'évaporation, fournit un produit jaune dont le point de fusion, peut net d'ailleurs, est de 205° (rendement 0 g. 50).

Plus tard DOHRN (2), trouve dans l'urine, en opérant dans les mêmes conditions, un dérivé fusible à 242°, qui a la formule d'un oxyatophan. Selon DOHRN, l'oxyatophan serait accompagné dans l'urine, d'un produit provenant d'une oxydation plus avancée, avec destruction du noyau benzénique dans le dérivé quino-léique. Ce serait un acide oxypyridinecarbonique formulé



sans autre indication.

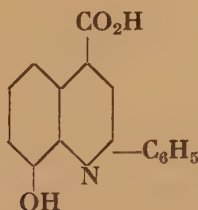
On saisit d'ailleurs mal le passage de l'atophan ou de l'oxyatophan à ce dérivé ; il suppose la destruction totale du groupement phényle attaché en position 2.

SKORCZEWSKI et SOHN (3), ont adopté un autre procédé d'extraction. L'urine acidifiée légèrement est épuisée plusieurs fois avec de l'éther. Les liqueurs éthérées, agitées avec une solution aqueuse de carbonate de sodium, conduisent à une solution alcaline du dérivé atophanique. Cette dernière, acidulée par

l'acide chlorhydrique dilué, abandonne un précipité jaune qui est purifié par cristallisations dans un mélange d'éther et d'éther de pétrole. Les auteurs obtiennent ainsi de petits cristaux aiguillés jaunes, dont le point de fusion est de 232°. L'analyse élémentaire de ces cristaux a confirmé qu'il s'agissait bien d'un oxyatophan.

Dès 1911, SKORCZEWSKI et SOHN (4) avaient montré que le dérivé de l'atophan qui s'élimine par l'urine, fournit une coloration intense avec le diazoréactif d'EHRlich, ainsi qu'une réaction avec le chlorure ferrique. Les auteurs font d'ailleurs remarquer que plus on pousse la purification de l'oxyatophan et plus la réaction qu'il donne avec le diazoréactif s'atténue, comme si le produit s'altérait profondément *in vitro*.

DOHRN, dans un autre mémoire (5) cherchant à identifier l'oxyatophan qu'il isole de l'urine sous forme d'un produit pur fondant à 245°, lui attribue la constitution de l'acide 8 oxy-2-phénylquinoléine-4 carbonique



lequel préparé par synthèse fond à 247° ; les isomères ayant le groupe hydroxyle en position 5-6-7, fondent respectivement à 225°, > 320° et 310° ; celui qui a un hydroxyle en position para dans le noyau phénilique latéral fond à 238°.

Il n'y a d'ailleurs aucun renseignement sur le point de fusion du produit naturel mélangé avec le 8 oxyatophan, qui serait plus probant pour l'identification.

Dans ce même mémoire, DHORN s'élève contre l'hypothèse d'une destruction de la molécule atophanique pendant les purifications successives, qu'avaient faite SKORCZEWSKI et SOHN. Ces derniers avaient en outre supposé que l'acide oxyypyridinecarbonique, se formait au cours de cette altération. DHORN s'appuyant sur le fait que la 2-oxyphényl-quinoléine, a pu être distillée sans altération par DÖBNER, déduit un peu hâtivement sans doute, que

la molécule d'oxyatophan est trop stable pour se prêter *in vitro*, à une aussi facile destruction.

Il ajoute que, si l'azoréaction voit son intensité décroître à mesure que l'on purifie le corps qui la donne, c'est parce que l'urine atophanique contient un troisième composé, de nature inconnue, dépourvu d'oxhydrile, qu'il a séparé grâce à son insolubilité dans l'acide acétique et qu'il caractérise par son point de fusion 310° et son analyse centésimale.

C	H	N
70,57	6,88	3,96

La faible teneur en azote n'a pas permis à DHORN de lui attribuer, en dehors d'un noyau quinoléique, une constitution se rattachant aux substances précédentes.

En résumé, un seul composé a été identifié dans l'urine après traitement atophanique ; ce serait le 8 oxyatophan. Il est accompagné d'un acide oxypyridinurique de constitution inconnue et d'un autre composé plus pauvre en azote, non encore étudié. SKORCZEWSKI et SOHN pensent d'ailleurs que le second produit n'est qu'un artefact formé *in vitro*, au cours de l'altération de l'oxyatophan.

Ajoutons quelques compléments d'information plus récents, les travaux précédents remontant à 1908-1912, époque de l'entrée de l'atophan en thérapeutique.

FURTH et KUH (6), ont montré que l'absorption intestinale de l'atophan est quasiment intégrale.

GRABFIELD et PRATT (7) constatent, au moyen de l'azoréaction que l'élimination urinaire des dérivés atophaniques, est nette entre la 2^e et la 31^e heure après l'absorption de l'atophan. STRANSKY (8) aurait signalé que l'élimination se fait aussi par la voie biliaire (cité par W. F. Von OETTINGEN (8 bis)).

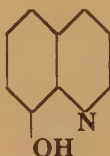
Enfin, A. J. QUICK (9) a noté l'apparition dans l'urine d'une substance lévogyre dont la nature n'a pas été reconnue.

Expériences personnelles

Nous avons essayé d'appliquer la méthode du relargage à l'étude de l'élimination de l'atophan. Laissant de côté les dérivés pyridiniques mal connus, nous nous occuperons uniquement de ceux qui possèdent encore le noyau quinoléique, c'est-à-dire de l'atophan et de l'oxyatophan.

Un essai préliminaire nous avait montré que l'atophanate de sodium en solution aqueuse, relargue pour des concentrations inférieures à 0 g. 10 par litre.

Ne possédant pas d'oxyatophan nous n'avons pu faire sur lui le même essai. Mais, par analogie, son relargage nous parut probable étant donné que l'orthoxyquinoléine



où l'on retrouve le même noyau, était facilement précipitée de sa solution, lors de la saturation par le sulfate d'ammonium.

Nous avons donc essayé d'extraire ces deux dérivés des urines recueillies après administration prolongée d'atophan à raison de 1 g. par jour.

Nous avons utilisé successivement les deux méthodes :

- a) Recherche dans le relargat lui-même ;
- b) Extraction au moyen d'un solvant non miscible, de l'urine saturée de sulfate d'ammonium.

a) Recherche dans le relargat lui-même

L'urine saturée de sulfate d'ammonium était filtrée comme d'habitude. Le relargat desséché était ensuite traité par la soude N et la solution alcaline séparée par filtration.

Pour caractériser les composés qui nous intéressent, il nous a semblé que le plus simple était de les extraire et de les doser comme l'atophan.

Parmi les diverses méthodes proposées, citons celle de SANCHEZ (10) qui précipite l'atophan par un excès de nitrate d'argent en milieu neutre et titre ensuite l'excès d'argent ; celle de CASTIGLIONI (11) qui précipite l'atophan par l'acide silicotungstique et calcine ensuite le silicotungstate pour peser le résidu de SiO_2 — Tu_2O_3 ; enfin celle de MARICQ (12) qui précipite l'atophan en milieu acide par une solution d'iodomercurate de potassium titrée en iodure de potassium et détermine ensuite l'excès d'iodure par iodométrie ou argentométrie.

L'application de ces méthodes à un milieu aussi complexe qu'une solution de relargat n'était pas sans aléas. La technique de MARICQ nous a semblé la moins sujette aux erreurs et nous avons en effet vérifié qu'un relargat d'urine normale n'entraîne pas de consommation sensible d'iodomercurate.

Pour cela, nous acidifions la solution alcaline de relargat. L'acide urique était éliminé par filtration, filtration qui est d'ailleurs laborieuse, les dernières traces d'acide urique ne précipitent que fort lentement et traversent les filtres. Puis, après addition d'iodomercurate titré et élimination du précipité, nous dosions IK en excès dans la solution claire.

Il faut noter ici que le dosage iodométrique est impossible car l'iode libéré oxyde d'abord les dernières traces d'acide urique que contient la solution.

Le dosage argentométrique est par contre aisé. Il nous a toujours donné des chiffres sensiblement nuls.

Il n'y a donc pas d'atophan dans le relargat. Mais cela ne veut pas dire que l'oxyatophan en soit absent. Nous avons en effet vérifié par la suite, que l'iodomercurate donne avec l'oxyatophan un complexe jaune qui est notablement soluble.

Quoi qu'il en soit, nous avons écarté cette première méthode car il semble bien que la majeure partie des dérivés atophaniques ne figure pas dans le relargat.

b) Extraction de l'urine totale saturée de sulfate d'ammonium

Nous utilisons ici une variante de l'extraction par relargage, qui pourra toujours être utilisée dans la recherche des composés que la saturation par SO_4Am_2 n'aurait pas entièrement précipités.

Pour cela, l'urine saturée de SO_4Am_2 est, sans filtration préalable, agitée avec un solvant non miscible que l'on sépare ensuite par décantation. L'éthanol nous a semblé le meilleur solvant de l'oxyatophan ; c'est lui que nous avons adopté.

Principe de cette extraction

L'urine est agitée à deux reprises avec de l'alcool fort. Les solutions alcooliques, séparées par décantation sont filtrées puis privées d'alcool par distillation.

La solution aqueuse résiduelle contient l'oxyatophan qu'on purifie par précipitation phosphotungstique.

Le phosphotungstate donne ensuite, par double décomposition avec l'eau de baryte, un phosphotungstate de baryum insoluble et une solution aqueuse d'atophanate de baryum qui, par acidification libère l'oxyatophan.

Mode opératoire : description d'une expérience

L'urine d'un malade prenant 1 g. d'atophan par jour depuis plus d'une semaine est recueillie (soit 1 l. 900 pour la journée) puis filtrée.

On la sature du sulfate d'ammonium et extrait à froid à deux reprises par agitation énergique avec le quart de son volume d'alcool à 95°.

Les solutions alcooliques décantées et filtrées sont ensuite distillées pour éliminer l'alcool, de préférence sous pression réduite.

La solution aqueuse résiduelle est additionnée de quelques grammes de bicarbonate de sodium et soumise à un entraînement à la vapeur d'eau qui élimine une bonne partie des phénols gênants.

On l'additionne ensuite d'un léger excès de phosphotungstate de sodium à 10 p. 100 (réactif de FOLIN et DENIS), après acidification franche au tournesol par l'acide sulfurique normal. Il faut éviter un excès de réactif phosphotungstique qui redissoudrait le précipité. Celui-ci est jaune, mais fréquemment souillé d'un dépôt noirâtre, visqueux, dont nous ignorons la nature et qui ne contient pas d'oxyatophan. Ce dépôt visqueux adhère d'ailleurs fortement au verre et on peut l'éliminer en majeure partie par décantation du liquide et du précipité jaune.

Ce dernier contient le phosphotungstate d'oxyatophan. On le sépare par filtration, puis on le lave avec un peu d'eau légèrement sulfurique.

On le purifie par dissolution dans la soude N, et reprécipitation de la solution au moyen de l'acide sulfurique N. Puis on le décompose à froid par un excès d'eau de baryte. Par filtration, on sépare une solution jaune, alcaline, d'oxyatophanate de baryum que l'on débarrasse de son excès de baryte par un courant de gaz carbonique. La solution neutre, lavée avec un peu d'éther de pétrole, est ensuite acidifiée peu à peu et sans excès au moyen

d'acide chlorhydrique dilué. Il faut éviter un excès d'acide qui redissoudrait le précipité. Celui-ci est de l'oxyatophan encore impur que l'on sépare par filtration. Après dessiccation, il pesait environ 0 g. 40.

Pour purifier le produit ainsi extrait, nous l'avons épuisé au moyen du chloroforme bouillant. La solution obtenue abandonnait à l'évaporation de fins cristaux aiguillés jaune serin (une dizaine de centigrammes) dont le point de fusion corrigé est de 239°.

Par recristallisation dans le méthanol, on obtient de fort belles tablettes jaune pâle, à angles droits, de section carrée ou rectangulaire.

Dans d'autres expériences, nous avons essayé de purifier le produit d'extraction par cristallisation dans l'acide acétique selon la technique préconisée par DOBNER pour l'oxyatophan synthétique. Malheureusement, dans tous les cas, l'acide acétique dissolvait le pigment urinaire qui avait suivi l'oxyatophan au cours de sa purification et, lors de l'évaporation du solvant, un brunissement intense du résidu indiquait une altération de notre composé. SKORCZEWSKI et SOHN (4) avaient déjà signalé ce phénomène. On sait d'autre part la facilité avec laquelle les phénols s'oxydent en présence de traces d'impuretés.

C'est pourquoi nous avons dû nous contenter de la cristallisation dans le chloroforme, bien qu'elle conduisit à de mauvais rendements, l'oxyatophan étant fort peu soluble même dans le chloroforme bouillant.

Propriétés du corps isolé

Nous avons vu que c'est un composé cristallin jaune de point de fusion instantané égal à 239°.

Il est insoluble dans l'éther de pétrole, très peu soluble dans l'eau, peu soluble dans le chloroforme, plus soluble dans l'éther, l'acide acétique (surtout à chaud), très soluble dans l'alcool.

Les alcalis le dissolvent abondamment, beaucoup mieux que les acides.

Sa solution acide précipite par l'acide phosphotungstique, l'iodomercurate de potassium, l'acide silicotungstique et le précipité est soluble dans un fort excès d'acide surtout dans les deux premiers cas.

Il présente les réactions de la fonction phénol et entre autres

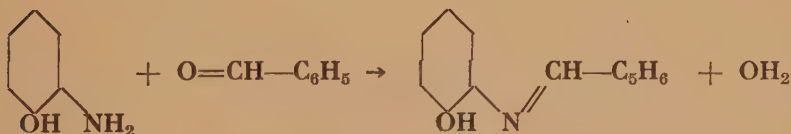
les réactions colorées: intense coloration rouge par le diazoréactif d'Ehrlich en milieu alcalin, coloration brun rouge par le réactif sulfotitanique, coloration rougeâtre par le perchlorure de fer dilué.

Identification

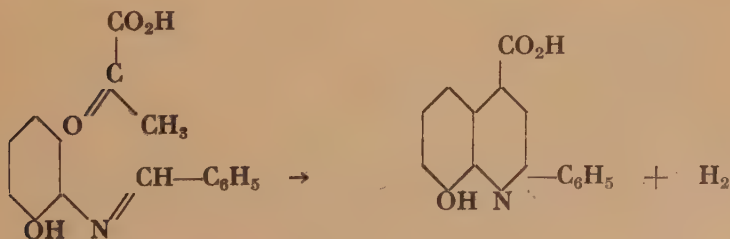
Pour décider si le produit d'élimination de l'atophan est bien l'acide 8 oxy-2-phénylquinoléine-4-carbonique, nous avons préparé synthétiquement ce dernier.

DOBNER en 1894 (13) avait donné une synthèse consistant à chauffer au bain-marie des quantités équimoléculaires d'orthoaminophénol d'aldéhyde benzoïque et d'acide pyruvique au sein de l'alcool. Le produit était purifié par cristallisations dans l'acide acétique. Les rendements de l'opération étant faibles, nous avons tenté de réaliser la synthèse en deux temps.

D'abord, condensant l'aldéhyde benzoïque et l'orthoaminophénol en une base de SCHIFF, selon la technique de PICTET et ANKERSMIT (14), nous avons obtenu le benzylidène orthoaminophénol avec d'excellents rendements; il est ainsi possible d'obtenir un produit relativement pur à partir de l'orthoaminophénol technique



mais la condensation de ce dernier avec l'acide pyruvique conduit par contre à des rendements décevants



ils peuvent s'expliquer par le fait que le benzylidène orthoami-

nophénol doit jouer le rôle secondaire d'oxydant vis-à-vis de l'hydrogène dégagé dans notre seconde réaction.

Nous sommes donc revenu à la technique de DOBNER dans laquelle l'un des réactifs joue mieux ce rôle oxydant ; nous avons obtenu finalement après purification un composé cristallin jaune, dont le point de fusion est égal à 245°. Ses propriétés physiques et chimiques sont identiques à celles de l'oxyatophan urinaire ; le maintien du point de fusion de l'oxyatophan d'origine biologique après mélange avec l'oxyatophan synthétique est encore plus probant pour l'identification des deux substances ; deux expériences nous ont conduit aux points de fusion instantanés et corrigés : 239° et 242°. Il n'y a pas dépression ; nous pouvons donc affirmer l'identité du produit naturel et du produit synthétique.

En résumé, la méthode de relargage nous a permis d'extraire de l'urine atophanique un corps pur que ses propriétés permettent d'identifier avec l'acide 8 oxy-2-phénylquinoléine-4-carbonique décrit par DOHRN, SKORCZEWSKI et SOHN et préparé autrefois synthétiquement par DOBNER.

Nous avons essayé de mettre au point une méthode précise de dosage de l'oxyatophan éliminé ; cette méthode est indispensable pour comparer l'élimination biliaire et l'élimination urinaire du médicament. Jusqu'ici nous n'avons pas obtenu de résultats satisfaisants.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) H. SCHROEDER et B. RAGINSKY, *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.*, 1932, 168, 413.
- (1 bis) NICOLAIER et DOHRN, *Deut. Arch. f. Klin. Med.*, 1908, 93, 331.
- (2) M. DOHRN, *Zeit. f. Klin. Med.*, 1912, 74, 445.
- (3) W. SKORCZEWSKI et I. SOHN, *Wien. klin. Woch.*, 1912, 25, 593.
- (4) W. SKORCZEWSKI et I. SOHN, *Wien. klin. Woch.*, 1911, n° 49.
- (5) M. DOHRN, *Biochem. Z.*, 1912, 43, 240.
- (6) O. FÜRTH et E. KUH, *J. Pharm. exp. Ther.*, 1930, 38, 57-71.
- (7) G.-P. GRABFIELD et J.-H. PRATT, *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1931, 42, 407.
- (8) E. STRANSKY, *Z. ges. exp. Méd.*, 1929, 66, 73.

(8 bis) W.-F. VON OETTINGEN, *The Therapeutic Agents of the Quinoline group. Chemical Catalog. Cy*, New-York 1933, p. 68.

(9) A.-J. QUICK, *J. Biol. Chem.*, 1932, 98, 157.

(10) J.-A. SANCHEZ, *Semana Méd.*, 1931, 1, 834.

(11) A. CASTIGLIONI, *Annali. Chim. Appl.*, 1935, 25, 240.

(12) MARICQ, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 1929, 38, 259 ; 1931, 40, 369.

(13) DÖBNER, *Ann. d. Chem.*, 1894, 281, 7.

(14) PICTET et ANKERSMIT, *Ann.* 1891, 266, 140.

CONCLUSIONS

Notre travail avait pour but l'application à l'étude chimique de l'urine d'une méthode fort ancienne mais peu utilisée dans ce cas : le relargage, la précipitation par le sulfate d'ammonium. Il permet d'extraire facilement en vue d'une caractérisation nette et parfois même d'un dosage des substances qui ne peuvent être mises en évidence ou dosées directement dans le milieu complexe qu'est l'urine.

Le relargage a en effet l'avantage de laisser en solution dans le liquide biologique ses constituants les plus abondants, ceux pour lesquels on dispose d'excellentes méthodes de dosage.

D'une façon générale, on peut dire que les substances qui échappent au relargage par le sulfate d'ammonium sont, d'une part, les sels minéraux, de l'autre, les molécules abondamment pourvues de groupements hydrophiles tels que — OH , — NH_2 , CO_2H , — CONH_2 , — CO — , = N — OH . Par contre, les molécules dans lesquelles les radicaux aliphatiques isocycliques ou hétérocycliques tiennent une part prépondérante vis-à-vis des groupements hydrophiles, sont plus ou moins complètement relarguées par le sulfate d'ammonium.

Dans quelques cas, le sel relarguant ne suffit pas à lui seul pour réaliser une précipitation totale de la substance à extraire. Nous avons montré qu'en conjuguant l'extraction par l'éthanol

avec la saturation par le sel d'ammonium, on peut extraire la totalité de la substance cherchée. En somme, on réalise de cette façon, avec un solvant miscible à l'eau, une extraction aussi facile, peut-être plus facile qu'avec les solvants non miscibles ; on peut ainsi profiter du très large pouvoir dissolvant et de la grande volatilité de l'éthanol.

Il est évident que cette méthode purement physique présente le grand avantage de réduire au minimum les chances d'altération des substances que l'on veut extraire de l'urine. Dans certains cas, elle est en outre plus efficace que les procédés classiques d'épuisement au moyen de solvants volatils ou de précipitation à l'aide de réactifs chimiques.

L'expérience nous a montré que l'on peut classer en trois groupes les constituants urinaux suivant la manière dont ils se comportent au cours du relargage. Parmi ceux que nous avons étudiés, nous citerons :

a) *Constituants non relargables :*

Urée, glucides, certains acides organiques (acétique, glycuronique, β oxybutyrique, ascorbique, acides dérivés de l'indol et du scatol), peptones, créatinine, dérivés de l'imidazol, urochrome et urochromogène.

b) *Constituants intégralement relargables, même pour de très faibles concentrations :*

Cholestérol, hormones sexuelles, enzymes, certains protides, certains acides biliaires, bilirubine, urobiline et leurs chromogènes

c) *Constituants imparfaitement relargables :*

Pour les faibles concentrations, leur précipitation peut même être nulle. L'extraction au moyen d'alcool, de l'urine saturée de sulfate d'ammonium, devient alors un procédé de choix pour l'isolement de certains d'entre eux. Quelques constituants urinaux normaux et les formes d'élimination de divers médicaments se rangent dans cette catégorie, nous avons montré qu'il en est ainsi pour l'acide urique, pour les dérivés barbituriques, l'oxyatophan.

Le relargage convient donc à l'étude quantitative ou qualitative des éliminations urinaires. Nous avons pu mettre au point de nouvelles méthodes de recherche ou de dosage des hormones

sexuelles, du *cholestérol*, des *enzymes* et de l'*oxyatophan* et une technique très rapide de détection des intoxications par les *barbituriques*.

Pour le dosage des *pigments biliaires*, le relargage n'ayant pu nous conduire à une technique simple, nous lui avons substitué une méthode empirique particulièrement sensible, qui fait l'objet d'un chapitre spécial.

Enfin, l'étude de la caractérisation des barbituriques nous a amené à préciser les conditions d'application de la réaction colorée de PARRI, à isoler les *combinaisons complexes du cobalt divalent* qui se forment dans cette réaction ou dans celle analogue de KOPPANYI. Nous avons d'autre part déterminé le groupement d'atomes qui intervient dans cette réaction prétendue spécifique et fournie en vérité par des substances assez variées. Nous en avons déduit les caractères qui permettent d'affirmer la présence d'un dérivé barbiturique dans une urine.

La méthode de relargage peut être étendue à d'autres liquides et à des substances que nous n'avons pas étudiées. La combinaison de l'extraction alcoolique et du relargage permettra dans beaucoup de cas, de passer des essais qualitatifs à des dosages. Nous nous proposons d'approfondir quelques-unes des recherches amorcées dans ce travail.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
G. ROUSSY.

Vu :
Paris, le 14 Mars 1938,
Le Doyen de la Faculté,
PAUL GUERIN.

Table des Matières

Introduction	11
--------------------	----

PREMIERE PARTIE

Notions générales sur le relargage	17
--	----

SECONDE PARTIE

<i>Application du relargage à l'étude des éliminations urinaires normales</i>	23
---	----

CHAPITRE PREMIER

Substances azotées

Urée	25
Acide urique	25
Acides aminés	26
Dérivés des acides aminés	26
Pigments urinaires	27
Bibliographie	28

CHAPITRE SECOND

Substances non azotées

Glucides	30
Acides organiques	30
Lipides	31
Cholestérol	32
Hormones	35
Auxines - Vitamines	37
Composés hors groupe	39
Enzymes	39
Bibliographie	40

TROISIEME PARTIE

43

Application du relargage à l'étude des éliminations urinaires pathologiques

CHAPITRE PREMIER

Substance d'origine purement endogène

Glucides et dérivés	45
Protides	45
Pigments anormaux - Substances biliaires de Purine	46
I. — Bilirubine.	
1° Recherches qualitatives	48
A) Méthodes spectroscopiques	48
B) Méthodes par oxydation	48
γ) Sur l'urine en nature	48
β) Après isolement des pigments biliaires	49
a) Précipitation	50
b) Extraction	51
C) Méthodes par azoréaction	51
D) Méthodes par addition à l'urine d'une matière colorante	52
Discussion de ces procédés - Recherches personnelles	
2° Recherches quantitatives	55
A) Méthodes spectroscopiques	55
B) Méthodes par oxydation	56
C) Méthodes par azoréaction	56
D) Méthodes par addition de colorant	57
Méthode personnelle	58
II. — Urobiline	66
Bibliographie	67

CHAPITRE SECOND

Substances d'origine exogène (médicamenteuse)

I. — Caractérisation des barbituriques dans l'urine	73
1° Extraction	77
2° Purification	77
3° Identification	80

CHAPITRE SPÉCIAL

Etude de la réaction des dérivés barbituriques avec les sels cobalteux

Etude qualitative	83
Etude quantitative - Préparation de quelques complexes cobalteux	91
Etude des propriétés et de la composition chimique des complexes cobalteux préparés	92
Essai de coordination de ces combinaisons complexes	94
Causes d'erreur dans la caractérisation des barbituriques	97
Bibliographie	98
II. — Etude de l'Élimination urinaire de l'Atophan	101
Anciens procédés d'isolement - Produits extraits	102
Expériences personnelles	104
Identification du produit extrait	109
Bibliographie	110
Conclusions	113

